

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 February 1999 (01.02.99)	
International application No. PCT/DE98/01689	Applicant's or agent's file reference
International filing date (day/month/year) 19 June 1998 (19.06.98)	Priority date (day/month/year) 20 June 1997 (20.06.97)
Applicant CALL, Hans-Peter	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
15 January 1999 (15.01.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Lazar Joseph Panakal

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

5.

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ::	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE98/01689	International filing date (day/month/year) 19 June 1998 (19.06.1998)	Priority date (day/month/year) 20 June 1997 (20.06.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC D21C 9/10		
Applicant BLUME, Hildegard		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 15 January 1999 (15.01.1999)	Date of completion of this report 14 October 1999 (14.10.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer  Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/01689

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-38, 40-92, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages 39, filed with the letter of 08 January 1999 (08.01.1999),  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-49, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/01689

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 20-30

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 20-30  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

**See the Supplemental Box.**

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. Claims 20-23 and 24-30, which are dependent thereon  
(see also Box VIII):

Claim 1 defines a composition consisting of 4 components, and consequently the presence of an additional component is excluded. Claims 20-30 define such additional components in contradiction to Claim 1. Furthermore, the definitions of and the difference between the specified "mediators" and the "mediation booster" are unclear, since the definitions thereof contain identical, overlapping or totally confusing terms (e.g. hydroxylamines/N-hydroxy compounds, NO-, NOH-HRN-OH-compounds, type).

Expressions such as "suitable oxidation catalyst" and "suitable oxidising agent" are also too vague and undefined.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 98/01689

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19, 31-49	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19, 31-49	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19, 31-49	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

**Novelty:** The following assessment of the novelty of the claims relating to the "enzyme component system" assumes that said claims relate to the product per se.

Reference is made to the following document:  
WO-A-97/13833 (D1).

Document D1 describes a bleaching composition for detergents, said composition containing ketone (page 5, lines 25-32), fatty acid, preferably C<sub>16-18</sub> (page 8, lines 11-17), enzymes such as amylases or lipases (page 13, lines 1-11) and a bleaching agent such as peroxy compounds with or without bleach activators (pages 14-16). Example 3 (sample C) on pages 28-30 discloses a composition containing ketone, potassium oleate, "Termamyl" (= amylase) and "PAP capsules" (= peroxy compound), in addition to other components.

None of the citations discloses a composition comprising the 4 components defined in Claim 1. A composition according to Claims 1-19 and the use thereof according to Claims 31-49 are therefore novel. These claims meet the requirements of PCT Article 33(2) (novelty).

**Inventive step:** Document EP-A-0 375 102 discloses the *in situ* production of peracid from a lipase, a peroxide and fatty acid. The composition as per the application differs therefrom by the presence of a ketone. It is also known that dimethyldioxirane can be produced *in situ* from peroxysulphuric acid and ketone (WO-A-94/18386).

The present invention addresses the problem of developing a very selective oxidising and bleaching system. None of the citations discloses or suggests to a person skilled in the art a composition with the four components of Claim 1 for solving this problem. A hydrolase is not used in any way as an oxidising system together with a fatty acid to form peracid and together with a ketone to form activated oxygen.

Substance Claims 1-19 and use Claims 31-49 therefore involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Large parts of the description represent superfluous repetitions of wordy definitions of substituents and statements concerning the composition of the enzyme component system; cf., for example, pages 10-11 and pages 79-80, pages 34-39 and pages 73-78.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. It is pointed out in general that the long lists of exemplary, optional or preferred embodiments in the present claims contradict the concision requirement of PCT Article 6. Furthermore, the claims as a whole lack clarity, since the large number of unclear expressions makes it difficult, if not impossible, to determine the subject matter for which protection is sought and therefore makes it unreasonably difficult for third parties to determine the scope of protection.

2. The expression "precursor oxidising agent" in Claims 1, 31, 38-40, 44, 46, 47 and 49 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature concerned. As a result, the definition of the subject matter of these claims is unclear (PCT Article 6). Since the application mentions only peroxy compounds as oxidising agents, the question is justifiably raised of which substances other than peroxy compounds could have this function.

3. Claim 11: since the ions and compounds specified are not oxidising agents (system components 3), there is a contradiction between Claims 1 and 11. Claim 11 is therefore unclear (PCT Article 6).

4. Claim 18 does not meet the requirements of PCT Article 6, since the expression "general carbonyl compounds" contradicts the definition of system component 4 in Claim 1 (restricted to ketones).

5. In relation to system component 4, Claim 19 refers

**VIII. Certain observations on the international application**

to Appendix 2 in which, however, compounds are specified that do not satisfy the definition of system component 4 in Claim 1 (e.g. anhydrides).

6. Numerous terms and expressions, such as those below, are worded too broadly, are completely undefined or are confusing in respect of the desired scope of protection:

"or another source" (Claim 4); "GOD" (Claim 13); "above all phenolic substances or polycycles" (Claim 20); "suitable oxidation catalyst", "suitable oxidising agent" (Claim 21); "NO-, NOH-HRN-OH- compounds" (Claim 22); "mediation booster", "non-phenols", "phenol derivatives", "radical cation compounds according to Wurster" (Claim 23); "oxygen species" (Claim 28); "Q-stage" (Claim 32); "pre- and/or post-treatments" (Claim 34); "swelling stage" (Claims 34 and 35); "solvent such as OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or OH/alcohols" (Claim 35); "other iron, manganese or copper complexors" (Claim 36); "neither washing nor extraction takes place" (Claim 37); "liquid waste from other branches of industry" (Claim 38); "wood composites" (Claim 40); "phenolic substances ... for changing ... and influencing the swelling behaviour of used paper" (Claim 40); "atro/lutro"; "mercapto compounds" (Claim 41); "conventional collector", "incopur types", "RSGA" (Claim 42); "as per the invention..." (Claim 45); "technically conventional and known detergent substances" (Claim 48). As a result, the definition of the subject matter and/or scope of protection of these claims is unclear (PCT Article 6).

6. References to the description (cf. Claims 8, 19, 20, 29) are not permitted (PCT Rule 6.2(a)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/DE 98/01689

**VIII. Certain observations on the international application**

7. The expressions "above all", "e.g.", and "etc." in Claims 4, 5, 10, 21, 23, 26, 34-36, 38 and 45 do not contain any restricting feature. The scope of these claims is unclear (PCT Article 6).

8. The back references to other claims in Claims 3 and 32-49 are clearly incorrect.

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 19 OCT 1999

WIPO PCT



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts ::	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01689	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/06/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 20/06/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK D21C9/10		
Anmelder BLUME, Hildegard et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
  - ☒ Grundlage des Berichts
  - ☐ Priorität
  - ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
  - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
  - ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
  - ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
  - ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
  - ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  15/01/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  14. 10. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Bernardo Noriega, F  Tel. Nr. +31 70 340 2581 



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01689

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-38,40-92                      ursprüngliche Fassung

39                              eingegangen am                      15/01/1999    mit Schreiben vom                      08/01/1999

### Patentansprüche, Nr.:

1-49                              ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,                      Seiten:
- ☐ Ansprüche,                              Nr.:
- ☐ Zeichnungen,                              Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 20-30.

### Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 20-30 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

**siehe Beiblatt**

- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-19, 31-49
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-19, 31-49
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-19, 31-49
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Ansprüche 20-23 und davon abhängige 24-30: (siehe auch Abschnitt VIII):  
Anspruch 1 definiert eine Zusammensetzung bestehend aus 4 Komponenten, so daß das Vorhandensein einer zusätzlichen Komponente ausgeschlossen ist. Ansprüche 20-30 definieren solche zusätzlichen Komponenten, im Widerspruch zu Anspruch 1. Weiterhin sind die Definition und der Unterschied zwischen den genannten "Mediatoren" und "Mediationsverstärker" nicht klar, deren Definitionen identische, überlappende oder ganz unverständliche Begriffe enthalten (z.B. Hydroxylamine/N-Hydroxyverbindungen, NO-, NOH-HRN-OH-Verbindungen, Typ). Bezeichnungen wie "geeigneten Oxidationskatalysator" und "geeignetes Oxidationsmittel" sind ferner zu vage und unbestimmt.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**Neuheit:** In der nachstehenden Beurteilung der Neuheit der auf "Enzym-Komponenten-System" gerichteten Ansprüche wird davon ausgegangen, daß diese Ansprüche auf das Produkt als solches gerichtet sind.

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen: D1: WO 97 13833

Dokument D1 beschreibt eine Zusammensetzung zur Bleiche in Waschmitteln, die Keton (Seite 5, Zeile 25-32), Fettsäure, bevorzugt C<sub>16-18</sub> (Seite 8, Zeile 11-17), Enzyme wie Amylase oder Lipase (Seite 13, Zeile 1-11) und Bleichmittel wie Perverbindungen mit oder ohne Bleichaktivatoren (Seite 14-16) enthält. Beispiel 3 (sample C) auf Seite 28-30 offenbart eine Zusammensetzung enthaltend Keton, Kaliumoleat, "Termamyl" (=amylase) und "PAP capsules" (= Perverbindung), nebst anderen Komponenten.

Keine der zitierten Entgegenhaltungen offenbart eine Zusammensetzung bestehend aus den 4 Komponenten wie in Anspruch 1 definiert. Somit ist ein Zusammensetzung nach Ansprüche 1-19 und deren Verwendung nach Ansprüche 31-49 neu.  
Diese Ansprüche erfüllen die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT (Neuheit).

**Erfinderische Tätigkeit:** EP 375102 offenbart die in situ Herstellung von Persäure aus einer Lipase, einem Peroxid und Fettsäure. Hievon unterscheidet sich die anmeldungsgemäße Zusammensetzung durch die Anwesenheit eines Ketons. Es ist auch bekannt, daß man in situ aus Perschwefelsäure und Keton Dimethyldioxiran herstellen kann (WO 9418386).

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein sehr selektives Oxidations- bzw. Bleichsystem zur Verfügung zu stellen. Eine Zusammensetzung mit den vier Komponenten von Anspruch 1 zur Lösung dieser Aufgabe geht jedoch aus keiner der zitierten Entgegenhaltungen hervor und wird dem Fachmann insofern nicht nahegelegt. In keiner Weise wird wie in der vorliegenden Erfindung eine Hydrolase zusammen mit einer Fettsäure zum Zweck der Persäurebildung und zusammen mit einem Keton zur Bildung von aktiviertem Sauerstoff als Oxidationssystem eingesetzt.  
Deswegen beruhen die Stoffansprüche 1-19 und Verwendungsansprüche 31-49 auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3)PCT).

## **Zu Punkt VII**

### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Weite Teile der Beschreibung stellen überflüssige Wiederholungen von weitschweifigen Substituentendefinitionen und Angaben zur Zusammensetzung der Enzym-Komponenten-System dar; siehe z.B. Seiten 10-11 und Seiten 79-80, Seiten 34-39 und Seiten 73-78.

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

1. Ganz allgemein ist darauf hinzuweisen, daß die langen Aufzählungen von beispielhaften, fakultativen bzw. bevorzugten Ausführungsformen in den vorliegenden Ansprüchen dem Erfordernis der Knappheit gemäß Artikel 6 PCT widersprechen. Ferner mangelt es den Ansprüchen insgesamt an Klarheit, da es aufgrund der Vielzahl unklarer Begriffe schwierig, wenn nicht unmöglich ist, den Gegenstand des Schutzbegehrens zu ermitteln, und damit Dritten die Feststellung des Schutzzumfangs in unzumutbarer Weise erschwert wird.
2. Der in dem Ansprüchen 1, 31, 38-40, 44, 46, 47, 49 benutzte Ausdruck "precursor-Oxidationsmittel" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüchen nicht klar ist (Artikel 6 PCT). Da in der Anmeldung nur Perverbindungen als Oxidationsmittel erwähnt sind, stellt sich berechtigterweise die Frage, welche andere Substanzen außer Perverbindungen diese Funktion haben könnten.
3. Anspruch 11: da die genannten Ionen und Verbindungen keine Oxidationsmittel sind (Systemkomponente 3), gibt es einen Widerspruch zwischen den Ansprüchen 1 und 11. Anspruch 11 ist deswegen unklar (Art. 6 PCT).
4. Anspruch 18 erfüllt nicht die Erfordernisse von Art. 6 PCT, da der Ausdruck "allgemeinen Carbonylverbindungen" im Widerspruch zur Definition der Systemkomponent 4 im Anspruch 1 steht (beschränkt auf Ketone).
5. Anspruch 19 verweist bezüglich der systemkomponent 4 auf Appendix 2, in dem jedoch Verbindungen aufgeführt sind, die nicht der Definition der systemkomponent 4 im Anspruch 1 genügen (u.a. Anhydride).

6. Zahlreiche Begriffe und Ausdrücke sind hinsichtlich des angestrebten Schutzzumfanges zu breit formuliert, völlig unbestimmt oder nicht verständlich, wie:

"oder andere Quelle" (Anspruch 4); "GOD" (A. 13); "v.a. phenolische Substanzen bzw. Polycyclen" (A. 20); "geeigneten Oxidationskatalysator" , "geeignetes Oxidationsmittel" (A. 21); "NO-, NOH-HRN-OH-Verbindungen" (A. 22); "Mediationsverstärker", "Nichtphenole", "Phenolabkömmlinge", "Radikalkationverbindungen nach Wurster" (A. 23); "Sauerstoffspezies" (A. 28); "Q-stufe" (A. 32); "Vor- und/oder Nachbehandlungen" (A. 34); "Quellstufe" (A. 34 und 35); "Lösungsmittel wie OH-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. OH-/Alkohole" (A. 35); "andere Eisen-, Mangan oder Kupfer-Komplexoren" (A. 36); "weder Wäsche noch Extraction stattfindet" (A. 37); "Abwässer anderer Industriezweige" (A. 38); Holzverbundstoffen" (A. 40); "phenolische Substanzen...zur Veränderung...und Beeinflussung des Altpapier-Quellverhaltens" (A. 40); "atro/lutro"; "Mercaptoverbindungen" (A. 41); "handelsübliche Sammler", "Incopur-Typen", "RSGA" (A. 42); "erfindungsmäßige.." (A. 45); "technisch üblichen und bekannten waschaktiven Substanzen" (A.48).

Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands und/oder Schutzzumfanges dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

6. Verweise auf die Beschreibung (siehe Ansprüche 8, 19, 20, 29) sind nach Regel 6.2a) PCT nicht zulässig.

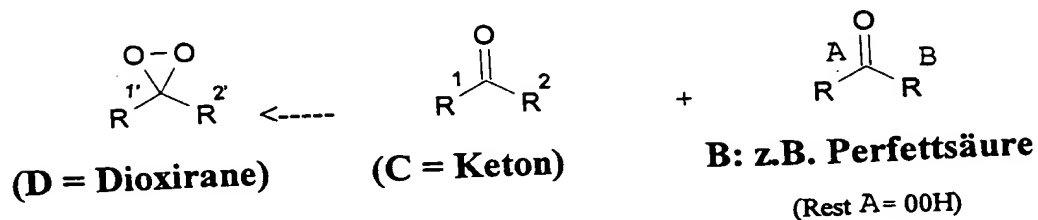
7. Die Ausdrücke "u.a.", "z. B.", "etc." in Ansprüchen 4, 5, 10, 21, 23, 26, 34-36, 38, 45 enthalten kein einschränkendes Merkmal. Der Umfang dieser Ansprüche ist nicht klar (Art. 6 PCT).

8. Die Rückbezüge auf andere Ansprüche in den Ansprüchen 3, 32-49 sind offensichtlich nicht korrekt.

Abbildung 1 zeigt schematisch einen möglichen Reaktionscyclus aller Komponenten:

Abb.1:

5



10



15



Lipase/Amidase

20

Komponente 1) = Enzym/ Hydrolase: z.B. Lipase/Amidase

Komponente 2) = Fettsäure (A)

25 Komponente 3) = Oxidationsmittel (Oxi)

Komponente 4) = Keton (C)

B) = z.B. Perfettsäure

30 D) = Dioxirane

35

40

45

07/11/00



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)07-12-00  
526 Rec CT/PTO

11 JUL 2000

(39) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup>:

D21C 9/10, 9/16, 5/00, 5/02

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/59108

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

09/446373

30. Dezember 1998 (30.12.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01689

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1998 (19.06.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 26 323.2 20. Juni 1997 (20.06.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BLUME,  
Hildegard [DE/DE]; Heinsberger Strasse 14a, D-52531  
Übach-Palenberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CALL, Hans-Peter [DE/DE];  
Kurfürstenstrasse 69, D-59821 Amsberg II (DE).(74) Anwalt: CALL, Krimhild; Heinsberger Strasse 14a, D-52531  
Übach-Palenberg (DE).(81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, FI, JP, US, europäisches Patent  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

09/446373

(54) Title: OXIDATION AND BLEACHING SYSTEM WITH ENZYMATICALLY PRODUCED OXIDIZING AGENTS

(54) Bezeichnung: OXIDATIONS- UND BLEICHSYSTEM MIT ENZYMATISCH HERGESTELLTEN OXIDATIONSMITTELN

(57) Abstract

The invention relates to an oxidation and bleaching system with enzymatically produced oxidizing agents, namely an enzyme component system (ECM) as an oxidation and bleaching system for the production of special highly selective oxidizing agents, consisting of a) system components 1) at least one hydrolase from the enzyme class 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 or 3.1.7 and/or at least one hydrolase from the enzyme class 3.5, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5 or 3.5.99; b) system components 2) at least one fatty acid, preferably containing C<sub>6</sub> to C<sub>26</sub> (saturated, monounsaturated or polyunsaturated); c) system components 3) at least one precursor oxidizing agent for reaction with the enzymes, and d) system components 4) at least one ketone from the group of the carbonyl compounds.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Oxidations- und Bleichsystem mit enzymatisch hergestellten Oxidationsmitteln beschrieben, nämlich ein Enzym-Komponenten-System (ECS) als Oxidations- und Bleichsystem zur Herstellung von speziellen hochselektiven Oxidationsmitteln, bestehend aus: a) Systemkomponente 1): mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 oder 3.1.7 und/oder mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.5, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5 oder 3.5.99; b) Systemkomponente 2): mindestens einer Fettsäure, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub> (gesättigt, einfach- oder mehrfach ungesättigt); c) Systemkomponente 3): mindestens einem Precursor-Oxidationsmittel zur Reaktion mit den Enzymen; d) Systemkomponente 4): mindestens einem Keton aus der Gruppe der Carbonylverbindungen.

07/17/2000 ERIMANDO 00000076 09446373

01 FC:198

130.00 OP



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen  PCT/DE 98/01689	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  19/06/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  20/06/1997
Anmelder  BLUME, Hildegard et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart: die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde.
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 

Abb. Nr. \_\_\_\_\_
 
  - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
  - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01689

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6	D21C9/10	D21C9/16	C12N9/00	C12P17/02	C02F3/02
	C08H5/02	C08L97/02	C09J197/00	D21C5/02	C11D3/386
	C11D1/04	C11D3/39	C11D3/20	D06P5/15	D06P5/13

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 D21C C12N C02F C11D D06P C08H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 13833 A (UNILEVER NV ; UNILEVER PLC (GB)) 17. April 1997  siehe Seite 5, Zeile 30 - Seite 15, Zeile 20 ---	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 47, 48
A	EP 0 375 102 A (CLOROX CO) 27. Juni 1990  siehe Seite 6, Zeile 1 - Zeile 58 siehe Seite 25 --- -/--	1, 2, 4, 6, 8, 10, 47-49



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Dezember 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bernardo Noriega, F

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

CALL, Krimhild  
Heinsberger Strasse 14a  
D-52531 Übach-Palenberg  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)		
Applicant's or agent's file reference		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/DE98/01689	International filing date (day/month/year) 19 June 1998 (19.06.98)	Priority date (day/month/year) 20 June 1997 (20.06.97)
Applicant BLUME, Hildegard et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

BR,CA,EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

FI

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 30 December 1998 (30.12.98) under No. WO 98/59108

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

CALL, Krimhild  
Heinsberger Strasse 14a  
D-52531 Übach-Palenberg  
ALLEMAGNE*unver. Signatur*

Date of mailing (day/month/year)

01 February 1999 (01.02.99)

Applicant's or agent's file reference

## IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/DE98/01689

International filing date (day/month/year)

19 June 1998 (19.06.98)

Priority date (day/month/year)

20 June 1997 (20.06.97)

Applicant

BLUME, Hildegard et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : BR, CA, JP, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : FI

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

Lazar Joseph *Signature*

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.00

Form PCT/IB/332 (September 1997)

2452223

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: DIE MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

# PCT

An

CALL, Krimhild  
Heinsberger Straße 14a  
D - 52531 Übach-Palenberg;  
ALLEMAGNE

MITTEILUNG ÜBER DEN EINGANG DES  
ANTRAGS BEI DER ZUSTÄNDIGEN MIT DER  
INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG  
BEAUFTRAGTEN BEHÖRDE

(Regeln 59.3 e) und 61.1 b) Satz 1 PCT sowie  
Abschnitt 601 a) der Verwaltungsvorschriften)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

26. 01. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

::

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/ 01689

Internationales Anmeldedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

19/06/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

20/06/1997

Anmelder

BLUME, Hildegard et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nachstehendes Datum als Eingangsdatum des Antrags auf internationale vorläufige Prüfung der internationalen Anmeldung betrachtet:

15/01/1999

2. Dieses Eingangsdatum entspricht:

- ☒ dem tatsächlichen Eingangsdatum des Antrags bei der Behörde (Regel 61.1 b)).  
☐ dem tatsächlichen Datum, an dem der Antrag für die Behörde entgegengenommen worden ist (Regel 59.3 e)).  
☐ dem Datum, an dem die Behörde auf die Aufforderung zur Behebung von Mängeln des Antrags (Formblatt PCT/IPEA/404) hin die erforderlichen Berichtigungen erhalten hat.

3. ☐ **ACHTUNG:** Das Eingangsdatum liegt **NACH** dem Ablauf von 19 Monaten ab dem Prioritätsdatum. Folglich führt die im Antrag erfolgte Auswahl von Vertragsstaaten nicht zu einer Verschiebung des Eintritts in die nationale Phase bis zu 30 (oder in manchen Ämtern mehr) Monaten ab dem Prioritätsdatum (Artikel 39 (1)). Daher müssen die für den Eintritt in die nationale Phase erforderlichen Handlungen innerhalb von 20 (oder in manchen Ämtern mehr) Monaten ab dem Prioritätsdatum (Artikel 22) vorgenommen werden. Nähere Einzelheiten sind dem *PCT-Leitfaden für Anmelder*, BAND II zu entnehmen.

☐ (falls zutreffend) Diese Mitteilung gilt als Bestätigung der am \_\_\_\_\_  
per Telefon, Fax oder persönlich erteilten Auskunft.

4. Nur wenn Punkt 3 zutrifft, wurde dem Internationalen Büro ein Exemplar dieser Mitteilung übermittelt.

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen  
Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk - Niederlande  
Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

M. Dekker  
Tel.: 4046

Tel.

RO/101 (2)

Blatt Nr. ....

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH			
Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>			
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Besitzungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	20. 06. 97	197 26 323.2-43	DE - Patentamt München
(2)			
(3)			

Dieser Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☒ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE**

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): ISA /

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt): Datum (Tag/Monat/Jahr): Aktenzeichen:

**Feld Nr. VIII KONTROLLISTE**

Diese internationale Anmeldung umfaßt:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
1. Antrag : Blätter	1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
2. Beschreibung : Blätter	2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht
3. Ansprüche : Blätter	3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift
4. Zusammenfassung : Blätter	4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen)
5. Zeichnungen : Blätter	5. <input type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Insgesamt : Blätter	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
	7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
	8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung Nr. der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

**Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

18. 6. 98 (Z. P. Cull)

Zhan-Rok Cull

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

RO/101 (3)

Blatt Nr. ....

<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH</b>		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	20.06.97	197 26 323.243	DE - Patentamt München
(2)			
(3)			
Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden): <input checked="" type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.			
<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b>			
Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): ISA /			
Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen. Staat (oder regionales Amt): Datum (Tag/Monat/Jahr): Aktenzeichen:			
<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE</b>			
Diese internationale Anmeldung umfaßt:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:	
1. Antrag : 4 Blätter	2. Beschreibung : 32 Blätter	3. Ansprüche : 14 Blätter	4. Zusammenfassung : 1 Blätter
5. Zeichnungen : 1 Blätter	Insgesamt : 114 Blätter		
		1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht	5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
		2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht	6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hien- liegenden Mikroorganismen
		3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift	7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
		4. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen)	8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflühren):
Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.			
<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>			
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.			
18.06.98 H. Blumey Blume			

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:		2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:			
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:			
5. Vom Anmelder benannte internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben		

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	
--	--

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

*neuer Spahn*

Absender: ANMELDEAMT

An  
Frau  
Krimhild Call  
Heinsberger Str. 14A  
52531 Übach-Palenberg

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE BESTÄTIGUNG  
VORSORGLICHER BESTIMMUNGEN

(Regel 4.9 c) PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

22.09.98

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01689

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

19. Juni 1998 (19.06.98)

Anmelder

Blume, Hildegard

1. ☒ Die Bestätigung vorsorglicher Bestimmungen ist vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum eingegangen.  
Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß am 17.07.1998 beim Anmeldeamt eine schriftliche Bestätigung eingegangen und die Zahlung der vorgeschriebenen Gebühren für die Bestimmung der nachstehenden Staaten erfolgt ist:  
☐ ARIPO-Patent (AP) ("alle Staaten" oder zweibuchstabigen Ländercode der entsprechenden Staaten angeben):  
☐ eurasisches Patent (EA): alle Staaten  
☐ europäisches Patent (EP) ("alle Staaten" oder zweibuchstabigen Ländercode der entsprechenden Staaten angeben):  
☐ OAPI-Patent (OP): alle Staaten  
☒ nationales Patent (zweibuchstabigen Ländercode der entsprechenden Staaten angeben):  
 FI
2. ☐ Die Bestätigung vorsorglicher Bestimmungen ist unvollständig oder verspätet eingegangen.  
Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß am \_\_\_\_\_ beim Anmeldeamt eine schriftliche Bestätigung vorsorglicher Bestimmungen eingegangen ist. Nach Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum war jedoch folgendes festzustellen:  
☐ es ist keine schriftliche Bestätigung mit der Angabe der zu bestätigenden Bestimmungen eingegangen.  
☐ es sind keine Gebühren gezahlt worden.  
☐ die gezahlten Gebühren reichen nicht zur Deckung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr für die nachstehenden Bestimmungen aus:  
 Die betreffenden Bestimmungen gelten daher nach Regel 4.9 b) als vom Anmelder zurückgenommen.
3. ☐ Im Antrag sind keine vorsorglichen Bestimmungen nach Regel 4.9 b) vorgenommen worden.
4. ☐ Überzahlungen (Punkt 1) bzw. gezahlte Gebühren (Punkt 2 oder 3) werden ordnungsgemäß zurückerstattet.
5. Die schriftliche Bestätigung wird zusammen mit dieser Mitteilung dem internationalen Büro übersandt.

Name und Postanschrift des Anmeldeamts

DEUTSCHES PATENTAMT  
80297 München  
Telefaxnr. (0 89) 21 95 - 22 21

Bevollmächtigter Bediensteter

Erber  
Telefonnr. (0 89) 21 95- 24 83



1 R 0 / 101 (1)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmelder auszufüllen

<b>PCT/DE 98/01689</b> Internationales Aktenzeichen
<b>19.598/19. Juni 1998</b> Internationales Anmeldedatum
Name des Anmelders und "PCT International Application"
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen)

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG **Oxidations- und Bleichsystem mit enzymatisch hergestellten Oxidationsmitteln**

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

**Beum Hildegard**  
**Heinsberger Straße 14a**  
**D 52531 Übach-Palenberg**

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

**DEUTSCH**

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

**DEUTSCHLAND**

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsländer☒ alle Bestimmungsländer mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

**Dr. Call Hans-Peter**  
**59821 Aursberg II**  
**Kurfürstenstraße 69**

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

**DEUTSCH**

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

**DEUTSCHLAND**

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsländer☐ alle Bestimmungsländer mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln:

☐ Anwalt☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

**Call, Krimhild**  
**Heinsberger Str. 14a**  
**D 52531 Übach-Palenberg**

Telefonnr.:

**02451/952812/43**

Telefaxnr.:

**02451/052842**

Fernschreibnr.:

☒ Dieser Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und stattdessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9713833	A	17-04-1997	US	5705465 A	06-01-1998
			AU	6925996 A	30-04-1997
			CA	2232582 A	17-04-1997
			CZ	9801038 A	14-10-1998
			PL	326005 A	17-08-1998
EP 0375102	A	27-06-1990	US	5108457 A	28-04-1992
			AT	136927 T	15-05-1996
			DE	68926286 D	23-05-1996
			DE	68926286 T	09-01-1997
			ES	2087864 T	01-08-1996
			JP	2225599 A	07-09-1990
			JP	2772564 B	02-07-1998
EP 0717143	A	19-06-1996	AT	171228 T	15-10-1998
			AU	688660 B	12-03-1998
			AU	4535096 A	03-07-1996
			BR	9506801 A	30-06-1998
			CA	2164394 A	17-06-1996
			CN	1142255 A	05-02-1997
			CZ	9602438 A	15-01-1997
			DE	59503612 D	22-10-1998
			WO	9618770 A	20-06-1996
			EP	0745154 A	04-12-1996
			FI	963210 A	16-08-1996
			HU	76126 A	30-06-1997
			JP	9503257 T	31-03-1997
			NO	963410 A	15-10-1996
			NZ	300571 A	26-01-1998
			PL	315913 A	09-12-1996
			SK	104096 A	05-02-1997
WO 9418386	A	18-08-1994	AU	6130794 A	29-08-1994
			BR	9405754 A	28-11-1995
			CA	2154778 A	18-08-1994
			EP	0681625 A	15-11-1995
			FI	953651 A	31-07-1995
			JP	8508791 T	17-09-1996
			NO	952913 A	21-07-1995
			NZ	262009 A	25-06-1996
US 5525121	A	11-06-1996	US	5437686 A	01-08-1995
			AU	697043 B	24-09-1998
			AU	2516095 A	05-12-1995
			CA	2190507 A	23-11-1995
			JP	10505365 T	26-05-1998
			NZ	285678 A	27-04-1998
			WO	9531527 A	23-11-1995
US 3822114	A	02-07-1974	GB	1368400 A	25-09-1974
			AU	4535772 A	14-02-1974
			CA	991364 A	22-06-1976
			CA	993754 A	27-07-1976
			CA	993755 A	27-07-1976
			CH	574497 A	15-04-1976
			DE	2238207 A	15-02-1973
			FR	2148302 A	11-03-1974
			NL	7210754 A	07-02-1973

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 3822114 A		SE 385718 B	19-07-1976
		US 4006092 A	01-02-1977
		BE 787276 A	07-02-1973
		JP 48025693 A	03-04-1973
		ZA 7205311 A	25-04-1973
		IE 37217 B	08-06-1977
EP 0453275 A	23-10-1991	JP 4001185 A	06-01-1992

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 717 143 A (LIGNOZYM GMBH) 19. Juni 1996  siehe Seite 15, Zeile 29; Ansprüche ----	1-7, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 21-37, 46
A	WO 94 18386 A (SOLVAY INTEROX ;UNIV NEW YORK (US)) 18. August 1994  siehe das ganze Dokument ----	1, 10, 16, 19, 31, 32, 34, 36
A	US 5 525 121 A (HEFFNER ROBERT J. ET AL) 11. Juni 1996  siehe Spalte 15, Zeile 1 - Zeile 18; Ansprüche ----	1-6, 10, 12, 16, 17, 47-49
A	US 3 822 114 A (MONTGOMERY R) 2. Juli 1974  siehe Spalte 13, Zeile 74; Ansprüche ----	1, 10, 12, 16, 19, 47-49
A	EP 0 453 275 A (NIPPON OIL CO LTD) 23. Oktober 1991 siehe Seite 3, Zeile 42 - Seite 4, Zeile 27 -----	1, 10, 12, 16, 17, 44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01689

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713833	A	17-04-1997	US 5705465 A	06-01-1998
			AU 6925996 A	30-04-1997
			CA 2232582 A	17-04-1997
			CZ 9801038 A	14-10-1998
			PL 326005 A	17-08-1998
EP 0375102	A	27-06-1990	US 5108457 A	28-04-1992
			AT 136927 T	15-05-1996
			DE 68926286 D	23-05-1996
			DE 68926286 T	09-01-1997
			ES 2087864 T	01-08-1996
			JP 2225599 A	07-09-1990
			JP 2772564 B	02-07-1998
EP 0717143	A	19-06-1996	AT 171228 T	15-10-1998
			AU 688660 B	12-03-1998
			AU 4535096 A	03-07-1996
			BR 9506801 A	30-06-1998
			CA 2164394 A	17-06-1996
			CN 1142255 A	05-02-1997
			CZ 9602438 A	15-01-1997
			DE 59503612 D	22-10-1998
			WO 9618770 A	20-06-1996
			EP 0745154 A	04-12-1996
			FI 963210 A	16-08-1996
			HU 76126 A	30-06-1997
			JP 9503257 T	31-03-1997
			NO 963410 A	15-10-1996
			NZ 300571 A	26-01-1998
			PL 315913 A	09-12-1996
			SK 104096 A	05-02-1997
WO 9418386	A	18-08-1994	AU 6130794 A	29-08-1994
			BR 9405754 A	28-11-1995
			CA 2154778 A	18-08-1994
			EP 0681625 A	15-11-1995
			FI 953651 A	31-07-1995
			JP 8508791 T	17-09-1996
			NO 952913 A	21-07-1995
			NZ 262009 A	25-06-1996
US 5525121	A	11-06-1996	US 5437686 A	01-08-1995
			AU 697043 B	24-09-1998
			AU 2516095 A	05-12-1995
			CA 2190507 A	23-11-1995
			JP 10505365 T	26-05-1998
			NZ 285678 A	27-04-1998
			WO 9531527 A	23-11-1995
US 3822114	A	02-07-1974	GB 1368400 A	25-09-1974
			AU 4535772 A	14-02-1974
			CA 991364 A	22-06-1976
			CA 993754 A	27-07-1976
			CA 993755 A	27-07-1976
			CH 574497 A	15-04-1976
			DE 2238207 A	15-02-1973
			FR 2148302 A	11-03-1974
			NL 7210754 A	07-02-1973

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE 98/01689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3822114 A		SE 385718 B	19-07-1976
		US 4006092 A	01-02-1977
		BE 787276 A	07-02-1973
		JP 48025693 A	03-04-1973
		ZA 7205311 A	25-04-1973
		IE 37217 B	08-06-1977
<hr/>			
EP 0453275 A	23-10-1991	JP 4001185 A	06-01-1992
<hr/>			

*copy*

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>D21C 9/10, 9/16, 5/00, 5/02</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/59108</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	30. Dezember 1998 (30.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE98/01689</b>		(81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, FI, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>19. Juni 1998 (19.06.98)</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>197 26 323.2      20. Juni 1997 (20.06.97)      DE</b>			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BLUME, Hildegard [DE/DE]; Heinsberger Strasse 14a, D-52531 Übach-Palenberg (DE).</b>			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>CALL, Hans-Peter [DE/DE]; Kurfürstenstrasse 69, D-59821 Arnsberg II (DE).</b>			
(74) Anwalt: <b>CALL, Krimhild; Heinsberger Strasse 14a, D-52531 Übach-Palenberg (DE).</b>			
(54) Title: <b>OXIDATION AND BLEACHING SYSTEM WITH ENZYMATICALLY PRODUCED OXIDIZING AGENTS</b>			
(54) Bezeichnung: <b>OXIDATIONS- UND BLEICHSYSTEM MIT ENZYMATISCH HERGESTELLTEN OXIDATIONSMITTELEN</b>			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to an oxidation and bleaching system with enzymatically produced oxidizing agents, namely an enzyme component system (ECM) as an oxidation and bleaching system for the production of special highly selective oxidizing agents, consisting of a) system components 1) at least one hydrolase from the enzyme class 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.2, 3.1.4 or 3.1.7 and/or at least one hydrolase from the enzyme class 3.5, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5 or 3.5.99; b) system components 2) at least one fatty acid, preferably containing C<sub>6</sub> to C<sub>26</sub> (saturated, monounsaturated or polyunsaturated); c) system components 3) at least one precursor oxidizing agent for reaction with the enzymes, and d) system components 4) at least one ketone from the group of the carbonyl compounds.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es wird ein Oxidations- und Bleichsystem mit enzymatisch hergestellten Oxidationsmitteln beschrieben, nämlich ein Enzym-Komponenten-System (ECS) als Oxidations- und Bleichsystem zur Herstellung von speziellen hochselektiven Oxidationsmitteln, bestehend aus: a) Systemkomponente 1): mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 oder 3.1.7 und/oder mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.5, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5 oder 3.5.99; b) Systemkomponente 2): mindestens einer Fettsäure, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub> (gesättigt, einfach- oder mehrfach ungesättigt); c) Systemkomponente 3): mindestens einem Precursor-Oxidationsmittel zur Reaktion mit den Enzymen; d) Systemkomponente 4): mindestens einem Keton aus der Gruppe der Carbonylverbindungen.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CA	Canada	IT	Italien	NE	Niger	VN	Vietnam
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland		
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



## Oxidations- und Bleichsystem mit enzymatisch hergestellten Oxidationsmitteln

Aus einer Reihe von Literaturstellen und Übersichtsarbeiten wie z.B.:

- 5 „Preparative Biotransformations“, S.M. Roberts, K. Wiggins, G. Casy, 1992, J. Wiley & Sons Ltd. ist bekannt, daß Enzyme, wie bestimmte Lipasen über die Bildung von Peroxisäuren, (Perfettsäuren) in der Lage sind, Epoxide zu bilden. So wird z.B. im System Lipase (aus *Candida antarctica*) unter kontinuierlicher Zugabe von  $H_2O_2$  und Vorhandensein von bestimmten Fettsäuren wie z.B. Tetradecaonsäure (Mystrinsäure) oder  
10 Dodecansäure (Laurinsäure) aus Cycloocten das entsprechende Epoxid gebildet.

Auch ist bekannt, daß aus Mangan-Peroxidasen + ungesättigte Fettsäuren Persäuren entstehen können, die wiederum als  $H_2O_2$ -Quelle für die Mangan-Peroxidasen dienen können (Literatur: B.W. Bogan, et. al., Applied and Enviromental Microbiology, Vol. 62, No.5, S. 1788- 1792).

15

Ebenso gibt es einige Patente, die die Bildung von Persäuren mit Hilfe von Haloperoxidasen zeigen.

Desweiteren ist bekannt, daß man in situ aus Persäuren oder Persäuresalzen (wie Oxon) und Aceton, als einfachstes Keton, Dimethyldioxiran herstellen kann. Ebenso finden weitere

- 20 Ketone anstelle von Aceton Anwendung. Die Herstellung von Dioxiranen kann auch als Reinsubstanz vor dem Einsatz als Oxidationsmittel erfolgen, allerdings ist die Stabilität problematisch (WO 92/13993).

Desweiteren ist aus dem kanadischen Patent 1,129,162 und aus US 5,034,096 und aus WO 96/ 13634 bekannt, daß bestimmte Metallionen wie z.B.  $Mo^{6+}$  +  $H_2O_2$  und Nitrilamide

- 25 +  $H_2O_2$  und Dicyandiamide +  $H_2O_2$  in der Lage sind, chemisch Dioxirane aus  $H_2O_2$  zu generieren. Hier geben sich überraschenderweise Kombinationsmöglichkeiten mit dem erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-System (ECS) (siehe unten) d.h. die enzymatisch generierten Dioxiranbildung kann weiter verstärkt werden.

- 30 Die Einsatzmöglichkeiten dieser sehr starken und sehr selektiven Oxidationsmittel ist für viele Oxidationsreaktionen denkbar (z.B. Epoxidreaktionen etc.). Seit einiger Zeit wird v.a. der Einsatz als Bleichmittel in der Zellstoffindustrie vorgeschlagen, der aber wegen der Gefährlichkeit der Herstellung und der hohen Kosten bisher keine Akzeptanz gefunden hat

(WO 92/13993).

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein sehr selektives Oxidations- bzw. Bleichsystem für den Einsatz in der Zellstoffbleiche oder Holzstoffbleiche, für den Einsatz zur oxidativen Behandlung von Abwässern aller Art, den Einsatz bei der Herstellung

5 von Holzverbundstoffen, für den Einsatz als enzymatisches Deinksystem, für den Einsatz als oxidatives Agens bei der organischen Synthese, für den Einsatz bei der Kohleverflüssigung, für den Einsatz als Bleichsystem in Waschmitteln, für den Einsatz als Bleichmittel oder Oxidationsmittel in der Textilindustrie (z.B. stone washing und Bleiche von Geweben) zur Verfügung zu stellen, welches viele der Nachteile von rein

10 chemischen Systemen (z.B. Umweltprobleme) oder enzymatischen Systemen (oft zu geringe Performance und hohe Kosten) nicht aufweist.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß z.B. bei Vorhandensein von bestimmten Lipasen, Oxidationsmitteln wie z.B.  $H_2O_2$ , bestimmten Fettsäuren und bestimmten Ketonen

15 z.B. eine Bleiche von Zellstoff bei gleichzeitiger erheblicher Reduktion der Kappazahl (Delignifizierung) erzielt wurde, d.h. es konnte überraschenderweise nachgewiesen werden, daß bei Vorhandensein der entsprechenden optimalen Komponenten in optimalem Verhältnis und Konzentrationen zueinander eine mit den chemischen Systemen zur Dioxiranbildung vergleichbare Bleichwirkung bei der oben genannten Zellstoffbleiche

20 erzielt werden kann.

Desweiteren konnte überraschenderweise eine erhebliche Bleichwirkung bei der Bleiche von Holzstoffen, Bleiche von Stoffen nach Deinkingprozessen, eine oxidative Polymerisation von Lignin und/oder ligninähnlichen Stoffen beim Einsatz bei der oxidativen Behandlung von Abwässern aller Art, wie Abwässern aus der Holzstoffherstellung

25 (Holzschliff, Refmerstoff), aus der Zellstoffindustrie und farbstoffbelasteten Abwässern, z.B. der Textilindustrie, nachgewiesen werden, wobei bei den meisten dieser Abwässer neben Entfärbung und Aufoxidierung und damit „Zerstörung“ umweltbelastender Stoffe, die Aufpolymerisierung von Ligninstoffen die bevorzugte Anwendung ist, damit verbunden die starke Vergrößerung der Moleküle, die leichtere und wesentlich kostengünstigere

30 Ausfällung dieser Polymerisate und damit Eliminierung aus der CSB- Bilanz.

Ebenfalls konnte diese oxidative Polymerisation von Lignin und/oder ligninähnlichen Stoffen überraschenderweise beim Einsatz bei der Herstellung von Holzverbundstoffen (Binder- und/oder Kleberherstellung durch oxidative Polymerisation der vorhandenen Polyphenylpropankörper) bestätigt werden. Darüberhinaus konnte ebenso

- überraschenderweise eine Druckfarbenablösung beim Deinkprozess (wahrscheinlich durch Quellung der ligninhaltigen Altpapierfasern verursacht) nachgewiesen werden. Ebenso wurde überraschenderweise Kohleverflüssigungseigenschaften bei der Behandlung von Braun- oder Steinkohle, gefunden. Daneben wurde ebenfalls
- 5 überraschenderweise eine hohe und selektive Oxidationskraft beim Einsatz als „Oxidationsmittel“ in der organischen Synthese, eine hohe Bleichkraft beim Bleichmitteleinsatz in Waschmitteln, bei der generellen Bleiche von Textilgeweben bzw. die spezielle Bleiche beim Einsatz bei Stone-wash-Prozessen, nämlich als Ersatz für die mechanische Farbentfernung und/oder Nachbleiche bei diesen Prozessen, bewiesen.
- 10 Das (die) verantwortliche(n) Oxidationsmittel können z.B. aus den vorhandenen Ketonen + der gebildeten Persäuren gebildete Dioxirane sein, die dann für die o.g. Anwendungen als Oxidations- oder Bleichmittel entweder alleine oder in Kombination mit den gebildeten Persäuren dienen.
- Die obige Aufgabe wird also dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-
- 15 Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, das eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind  $C_6$  bis  $C_{26}$  -, besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$  - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter
- 20 Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt  $H_2O_2$  (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponent 4) z.B. Dioxirane produzieren können.

25 Beschreibung der verschiedenen Anwendungen des erfindungsgemäßen Enzym-Komponentensystems (ECS):

- I) Einsatz in der Zellstoff/Holzstoffbleiche,
- II) Einsatz:
- 30 a) bei der Behandlung von v.a. Holzstoffabwässern der Papierindustrie und  
b) Abwässer anderer Industriezweige,
- III) Einsatz bei der Herstellung von Ligninlösungen oder Gelen, von entsprechenden Bindern/Klebern und von Holzverbundstoffen,
- IV) Einsatz als enzymatisches Deinksystem,

- V) Einsatz als Oxidationssystem bei der organischen Synthese
- VI) Einsatz bei der Kohleverflüssigung
- VII) Einsatz als Bleichmittel in Waschmitteln
- VIII) Einsatz in der Beiche/Entfärbung von Textilgeweben.

5

**D) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) in der Zellstoff/Holzstoffbleiche**

Als heute hauptsächlich zur Zellstoffherstellung verwendete Verfahren sind das Sulfat- und das Sulfitverfahren zu nennen. Mit beiden Verfahren wird unter Kochung und unter Druck Zellstoff erzeugt. Das Sulfat-Verfahren arbeitet unter Zusatz von NaOH und Na<sub>2</sub>S, während im Sulfit-Verfahren Ca(HSO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub> zur Anwendung kommen, bzw. heute wegen ihrer besseren Löslichkeit die Natrium- oder Ammoniumsalze des Hydrogensulfits.

- 15 Alle Verfahren haben als Hauptziel die Entfernung des Lignins aus dem verwendeten Pflanzenmaterial, Holz oder Einjahrespflanzen.

Das Lignin, das mit der Cellulose und der Hemicellulose den Hauptbestandteil des Pflanzenmaterials (Stengel oder Stamm) ausmacht, muß entfernt werden, da es sonst nicht möglich ist, nicht vergilbende und mechanisch hochbelastbare Papiere herzustellen.

Die Holzstofferzeugungsverfahren arbeiten mit Steinschleifern (Holzschliff) oder mit Refinern (TMP), die das Holz nach entsprechender Vorbehandlung (chemisch, thermisch oder chemisch-thermisch) durch Mahlen defibrillieren.

- 25 Diese Holzstoffe besitzen noch einen Großteil des Lignins. Sie werden v. a. für die Herstellung von Zeitungen, Illustrierten, etc. verwendet.

Seit einigen Jahren werden die Möglichkeiten des Einsatzes von Enzymen für den Ligninabbau erforscht. Der Wirkmechanismus derartiger lignolytischer Systeme ist erst vor wenigen Jahren aufgeklärt worden, als es gelang, durch geeignete Anzuchtbedingungen und Induktorzusätze bei dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* zu ausreichenden Enzymmengen zu kommen. Hierbei wurden die bis dahin unbekannten Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen entdeckt. Da *Phanerochaete chrysosporium* ein sehr effektiver Ligninabbauer ist, versuchte man dessen Enzyme zu isolieren und in gereinigter Form für

den Ligninabbau zu verwenden. Dies gelang jedoch nicht, da sich herausstellte, daß die Enzyme vor allem zu einer Repolymerisation des Lignins und nicht zu dessen Abbau führen.

Ähnliches gilt auch für andere lignolytische Enzymspezies wie Laccasen, die das Lignin mit Hilfe von Sauerstoff anstelle von Wasserstoffperoxid oxidativ abbauen. Es konnte festgestellt werden, daß es in allen Fällen zu ähnlichen Prozessen kommt. Es werden nämlich Radikale gebildet, die wieder selbst miteinander reagieren und somit zur Polymerisation führen.

10 So gibt es heute nur Verfahren, die mit in-vivo Systemen arbeiten (Pilzsysteme).  
Hauptschwerpunkte von Optimierungsversuchen sind das sogenannte Biopulping und das Biobleaching.

Unter Biopulping versteht man die Behandlung von Holzhackschnitzeln mit lebenden Pilzsystemen.

15 Es gibt 2 Arten von Applikationsformen:

1. Vorbehandlung von Hackschnitzeln vor dem Refinern oder Mahlen zum Einsparen von Energie bei der Herstellung von Holzstoffen (z.B. TMP oder Holzschliff).

Ein weiterer Vorteil ist die meist vorhandene Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Stoffes, ein Nachteil die schlechtere Endweiße.

20

2. Vorbehandlung von Hackschnitzeln (Softwood/Hardwood) vor der Zellstoffkochung (Kraftprozeß, Sulfitprozeß).

Hier ist das Ziel, die Reduzierung von Kochchemikalien, die Verbesserung der Kochkapazität und "extended cooking".

25 Als Vorteile werden auch eine verbesserte Kappareduzierung nach dem Kochen im Vergleich zu einem Kochen ohne Vorbehandlung erreicht.

Nachteile dieser Verfahren sind eindeutig die langen Behandlungszeiten (mehrere Wochen) und v.a. die nicht gelöste Kontaminierungsgefahr während der Behandlung, wenn man auf  
30 die wohl unwirtschaftliche Sterilisation der Hackschnitzel verzichten will.

Das Biobleaching arbeitet ebenfalls mit in-vivo Systemen. Der gekochte Zellstoff (Softwood/Hardwood) wird vor der Bleiche mit dem Pilz beimpft und für Tage bis Wochen behandelt. Nur nach dieser langen Behandlungszeit zeigt sich eine signifikante

Kappazahlerniedrigung und Weißsteigerung, was den Prozeß unwirtschaftlich für eine Implementierung in den gängigen Bleichsequenzen macht.

Eine weitere, meist mit immobilisierten Pilzsystemen, durchgeführte Applikation ist die Behandlung von Zellstofffabrikationsabwässern, insbesondere Bleichereiabwässern zu deren Entfärbung und Reduzierung des AOX (Reduzierung von chlorierten Verbindungen im Abwasser, die Chlor- oder Chlordioxid-Bleichstufen verursachen.

Darüber hinaus ist bekannt, Hemicellulasen u.a. Xylanasen, Mannanasen als "Bleichbooster" einzusetzen.

Diese Enzyme sollen hauptsächlich gegen das nach dem Kochprozeß das Restlignin zum Teil überdeckende reprecipitierte Xylan wirken und durch dessen Abbau die Zugänglichkeit des Lignins für die in den nachfolgenden Bleichsequenzen angewendeten Bleichchemikalien (v.a. Chlordioxid) erhöhen. Die im Labor nachgewiesenen Einsparungen von Bleichchemikalien wurden in großem Maßstab nur bedingt bestätigt, so daß man diesen Enzymtyp allenfalls als Bleichadditiv einstufen kann.

15

In der Anmeldung PCT/EP87/00635 wird ein System zur Entfernung von Lignin aus lignin-cellulosehaltigem Material unter gleichzeitiger Bleiche beschrieben, welches mit lignolytischen Enzymen aus Weißfäulepilzen unter Zusatz von Reduktions- und Oxidationsmitteln und phenolischen Verbindungen als Mediatoren arbeitet.

20

In der DE 4008893C2 werden zusätzlich zum Red/Ox-System "Mimic Substanzen", die das aktive Zentrum (prothetische Gruppe) von lignolytischen Enzymen simulieren, zugesetzt. So konnte eine erhebliche Performanceverbesserung erzielt werden.

In der Anmeldung PCT/EP92/01086 wird als zusätzliche Verbesserung eine Redoxkaskade mit Hilfe von im Oxidationspotential "abgestimmten" phenolischen oder nichtphenolischen Aromaten eingesetzt.

Bei allen drei Verfahren ist die Limitierung für einen großtechnischen Einsatz die Anwendbarkeit bei geringen Stoffdichten (bis maximal 4%) und bei den beiden letzten Anmeldungen zusätzlich die Gefahr des "Ausleachens" von Metallen beim Einsatz der Chelatverbindungen, die v.a. bei nachgeschalteten Peroxidbleichstufen zur Zerstörung des Peroxids führen können.

Aus WO 94/12619, WO 94/12620 und WO 94/12621 sind Verfahren bekannt, bei welchen die Aktivität von Peroxidase mittels sogenannter Enhancer-Substanzen gefördert wird.

Die Enhancer-Substanzen werden in WO 94/12619 anhand ihrer Halbwertslebensdauer charakterisiert.

Gemäß WO 94/12620 sind Enhancer-Substanzen durch die Formel  $A=N-N=B$  charakterisiert, wobei A und B jeweils definierte cyclische Reste sind.

- 5    Gemäß WO 94/12620 sind Enhancer-Substanzen organische Chemikalien, die mindestens zwei aromatische Ringe enthalten, von denen zumindest einer mit jeweils definierten Resten substituiert ist.

- Alle drei Anmeldungen betreffen "dye transfer inhibition" und den Einsatz der jeweiligen Enhancer-Substanzen zusammen mit Peroxidasen als Detergent-Additiv oder Detergent-  
10    Zusammensetzung im Waschmittelbereich.

Zwar wird in der Beschreibung der Anmeldung auf eine Verwendbarkeit zum Behandeln von Lignin verwiesen, aber eigene Versuche mit den in den Anmeldungen konkret offenbarten Substanzen zeigten, daß sie als Mediatoren zur Steigerung der Bleichwirkung der Peroxidasen beim Behandeln von ligninhaltigen Materialien keine Wirkung zeigten!

15

WO 94/29510 und WO 96/ 18770 beschreiben ein Verfahren zur enzymatischen Delignifizierung, bei dem Enzyme zusammen mit Mediatoren eingesetzt werden. Als Mediatoren werden allgemein Verbindungen mit der Struktur  $NO-$ ,  $NOH-$  oder  $HRNOH$  offenbart.

- 20    Von den in WO 94/29510 und WO 96/ 18770 aufgeführten Mediatoren liefert 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HBT) die besten Ergebnisse in der Delignifizierung. HBT hat jedoch verschiedene Nachteile:

- \* Es ist nur zu hohen Preisen und nicht in hinreichenden Mengen verfügbar.
- \* Es reagiert unter Delignifizierungsbedingungen zu 1H-Benzotriazol und gefärbten andern  
25    Produkten.
- \* Diese Verbindung ist relativ schlecht abbaubar und kann in größeren Mengen eine Umweltbelastung darstellen.
- \* Es führt in gewissem Umfang zu einer Schädigung von Enzymen.
- \* Seine Delignifizierungsgeschwindigkeit ist nicht allzu hoch.

- 30    Weitere Mediatoren des beschriebenen  $NO-$ ,  $NOH-$  und  $HRN-OH$ -Typs zeigen die meisten dieser Nachteile nicht, haben aber immer noch den Nachteil des relativ hohen Chemikalieneinsatzes, wobei die eingesetzten Chemikalien v.a. auch durch ihre physiologische Reaktivität nicht ganz unbedenklich sein können ( meist  $NO$ -Radikalbildung).

Es ist daher wünschenswert, Systeme zum Verändern, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen zur Verfügung zu stellen, die die genannten Nachteile nicht oder in geringerem Maße aufweisen.

- Es wurde nun völlig überraschend gefunden, daß beim Einsatz des erfindungsmäßigen
- 5 Enzym-Komponenten-Systems (ECS) ähnliche oder bessere Delignifizierungs- und Bleich-  
ergebnisse im Vergleich zu den oben erwähnten Oxidoreduktase-Mediatorssystemen erreicht  
wurden und die genannten Nachteile zu vernachlässigen sind, d.h.  
die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-  
Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere
- 10 Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder  
mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente  
1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind C<sub>6</sub> bis  
C<sub>26</sub> -, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub> - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter  
Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 15 (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente  
vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren kann.

- IIa) Der Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) zur
- 20 enzymatischen Behandlung von Spezialabwässern (Papierindustrieabwässer z.B.  
aus Holzschliff- Anlagen oder Refineranlagen)

- Oxidasen und Peroxidasen weisen im Gegensatz zu den meisten Enzymen eine geringe  
Substratspezifität auf, d.h. sie können ein breites Spektrum von Substanzen, im Normalfall
- 25 phenolischer Natur, umsetzen. Ohne Mediatoren neigen die Oxidasen, aber auch viele  
Peroxidasen dazu, phenolische Substanzen radikalisch zu polymerisieren, eine Eigenschaft,  
die z.B. der zu den Oxidasen gehörenden Laccase auch in der Natur zugeschrieben wird.  
Diese Fähigkeit, geeignete Stoffe wie z.B. Lignine zu polymerisieren, d.h. die  
entsprechenden Moleküle durch „Kopplungsreaktionen“ zu vergrößern kann z.B. zur
- 30 Behandlung ligninhaltiger Abwässer der Papierindustrie wie TMP-Abwässer (Abwässer aus  
der Herstellung von thermomechanical pulp mittels Refinern) sowie Schleifereiabwässer aus  
Holzschliffanlagen genutzt werden.

Die in diesen Abwässern enthaltenen wasserlöslichen Ligninverbindungen  
(Polyphenolpropankörper) sind hauptsächlich verantwortlich für den hohen CSB



(Chemischen Sauerstoffbedarf = hohe Belastung mit organischem Material) und können mit herkömmlicher Technologie nicht entfernt werden. In der Kläranlage und den nachfolgenden Gewässern sind sie nicht oder nur sehr langsam abbaubar. Diese Verbindungen können sogar bei zu hohen Konzentrationen hemmend auf die Bakterien einer Kläranlage wirken und zu Störungen führen.

Die Enzymwirkung ist bei dieser Anwendung sofort durch eine rasche Eintrübung des behandelten Abwassers zu erkennen, verursacht durch die vergrößerten und damit unlöslich werdenden Ligninmoleküle. So durch enzymatische Katalyse im Molekulargewicht vergrößert, lassen sich die Zielmoleküle (polymerisiertes Lignin) durch entsprechende Behandlungen (Flokkulation, Fällung z.B. mit Aluminiumsulfat/Natriumaluminat, eventuell unter Zugabe von Polyelektrolyten /kationisch oder anionisch oder Sedimentation) entfernen. Das Abwasser weist danach einen deutlich reduzierten CSB auf. Es verursacht somit bei der Einleitung eine geringere Umweltbelastungen, bzw. erhöht die Sicherheit, unter den gestatteten CSB- Belastungsgrenzen zu bleiben, was v.a. bei einer „Fahrweise“ am Limit, was nicht selten der Fall ist, wichtig ist.

Bei dieser Behandlung mit z.B. nur Laccase stellt allerdings der Aufwand für die Entfernung der Reaktionsprodukte der enzymatischen Behandlung durch Flokkulierung, Sedimentation oder Fällung oder Kombinationen mehrerer Methoden den bei weitem überwiegenden Anteil der Kosten für den Gesamtprozeß dar.

Es wurde nun völlig überraschenderweise gefunden, daß beim Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) bei spezieller Kombination der Komponenten eine im Vergleich zu den oben geschilderten enzymatischen Systemen überlegene Effizienz erreicht werden kann, d.h. das erfindungsmäßige Verfahren stellt ein gegenüber den oben genannten Systemen mit Oxidoreduktasen (wie z.B. Laccasen) als Oxidationskatalisatoren ein wesentlich verbessertes System dar, dessen Vorteile v.a. in seiner höheren Oxidationskraft, in der Verwendung von sehr leicht abbaubaren Fettsäuren und Ketonen (z.B. Benzophenonen) liegt, die zwar den CSB kurzfristig erhöhen, allerdings in den nachfolgenden Kläranlageschritten leicht zu entfernen sind, d.h.

die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind C<sub>6</sub> bis

C<sub>26</sub> -, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub> - Fettsäuren) ( Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

( Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.

- 5 Zu diesem System werden weitere spezielle Verbindungen (Polymerisationskatalysatoren) gegeben, die als Kondensationskerne dienen und die oxidative Ligninpolymerisation wesentlich verstärken können, so daß ein Hauptziel dieser enzymatischen Abwasserbehandlung, der möglichst geringe Einsatz von kostenintensivem Fällmittel, erreicht werden kann.

10

## II b) Einsatz zur enzymatischen Behandlung von Abwässern anderer Industriezweige

- Alle Abwässer von Industriezweigen, in denen phenolische oder generell oxidierbare Substanzen enthalten sind (z.B. Lignin, Farbstoffe etc.), können prinzipiell mit z.B. den oben genannten Oxidoreduktasen behandelt werden. Es kommen also z.B. Abwässer von Keltereien, Olivenmühlen, von Färbereien im Bereich der Textilindustrie, Abwässer aus Zellstoffwerken etc. für eine solche Behandlung in Frage. Allerdings sollten möglichst die belasteten Teilströme vor Vermischung mit anderen Abwässern behandelt werden, um optimale Effizienz zu erzielen.

- Auch hier wurde überraschenderweise gefunden, daß der Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) sich sehr gut zur Behandlung der oben genannten Abwässer eignet und z.T. Performancevorteile gegenüber Oxidoreduktasesystemen besitzt. Auch hier ist der Zusatz der oben genannten speziellen Verbindungen:

- Polymerisationskatalysatoren vorgesehen. Solche Stoffe können Phenole, Phenolderivate oder andere phenolische Polycyclen mit einer Reihe von oxidierbaren Hydroxylgruppen sein.

Solche Polymerisationskatalysatoren z.B. sind vorzugsweise:

- Alizarin, 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure, 3-Aminophenol, Brenzkatechin, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan, Bis-(4-hydroxyphenyl)-methan, Chinalizarin, 4-Chlor-1-naphthol, Coniferylalkohol, 2,4- Diaminophenoldihydrochlorid, 3,5-Dichlor-4-hydroxyanilin, 1,4-Dihydroxyanthrachinon, 2,2-Dihydroxybiphenyl, 4,4-Dihydroxybiphenyl, 2,3-Dihydroxynaphthalin, 2,6-Diisopropylphenol, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzhydrazin, 2,5-Di-tert.-butyl-hydrochinon, 2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol, 4-Hydroxybiphenyl,

- 2-Hydroxydiphenyl-methan, 2-(2-Hydroxyphenyl)-benzothiazol, 5- Indanol,  
 2-Isopropoxyphenol, 4-Isopropyl-3-methylphenol, 5-Isopropyl-2-methylphenol, 4-  
 Isopropylphenol, Laurylgallat, 2-Naphthol, 4-Nonylphenol, 3-(Pentadecyl)-phenol, 2-  
 Propylphenol, 4-Propylphenol, Purpurin, Pyrogallol, 4-(1,1,3,3-Tetra-methylbutyl)-phenyl,  
 5 1,2,4-Trihydroxybenzol, 2,4,6-Trimethylphenol, , 2,3,5-Trimethylphenol, 2,3,6-  
 Trimethylphenol, 3,4,5-Trimethylphenol, 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin, 2-(2-  
 Hydroxyethoxy)- benzaldehyd, 1-Naphthol, Nordihydroguaiaretsäure, Octylgallat, Silibinin,  
 3,4,6- Trihydroxybenzoesäure-octylester, 2,4,6-Tri-tert.-butylphenol, 2,4-Di-tert.-  
 butylphenol, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Ethoxyquin, 1-Aminoanthraquinon, 2-Amino-5-  
 10 chlorobenzophenon, 4-Aminodiphenyl-amin, 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalensulfonsäure,  
 2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazol, Benzanthron, Trioctyltrimellitat, trans-Chalcon,  
 Bis-(4-amino-phenyl)-amin-sulfat, 2,2'-Ethylidenbis-(4,6-di-tert.-butylphenol), 2,2-Bis-(2,6-  
 dibrom-4-(2-hydroxy-ethoxyphenyl)-propan, Bis-(3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
 methan, 2,2-Bis-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-propan, Bismarck Brown Y, 1-  
 15 Bromonaphthalen, 4-Butylanilin, 2-tert.-butyl-5-methylphenol, 1-Chloroanthrachinon, 2-  
 Chloroanthrachinon, Triallyl-1,3,5-benzotricarboxylat, 1,1-Tris-(hydroxymethyl)-propan-  
 trimethacrylat, Pentaerythrityl-triacrylat, 1,2,4-Trivinylcyclohexan, trans,cis-Cycloododeca-  
 1,5,9-trien, Pentaerythritol-tetrabenzoat, 4,4'-Methylenbis-(2,6-di-tert.-butylphenol), 4,4'-  
 Isopropyliden-bis(2,6-dichlorophenol), 4,4'-Isopropyliden-bis(2,6-dibromphenol), 4,4'-  
 20 Isopropyliden-bis(2-(2,6-dibrom-phenoxy)ethanol, 2,2'Etylidenbis-4,6-di-tert.-butyl-  
 phenol), 3-tert-Butyl-4-hydroxy-5-methyl-phenyl, 5-tert-Butyl-4-hydroxy-2-methyl-phenyl,  
 Syringaldazin, 4,4'-Dimethoxy-triphenylmethan, Di-sec. Butylphenol.  
 Weiterhin besonders bevorzugt sind Stoffe , die mehrere Hydroxylgruppen besitzen wie:  
 Ellagsäure, Gallussäure, Gallein, Gallangin, Myo-Inositol, Morin, Nitranilsäure,  
 25 Phenolphthalein, Purpurin, Purpurogallin, Quinizarin, Chrysazin, Quercitin, Quinhydrin,  
 Chloranilsäure, Carmin, Rhodizonsäure, Croconsäure, Melliticsäure, Hematoxin, 9-Phenyl-  
 2,3,7-trihydroxy-6-fluoren, 9-Methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluoren, Tetrahydroxy-p-  
 benzochinon, 2,2',4,4'-Tetra-hydroxybenzophenon, Pyrogallol Red, 1-Nitrophloroglucinol,  
 1,4-Dihydroxyanthrachinon, 5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon,  
 30 Hexaoxocyclohexanoctahydrat, 5,7-Dihydroxyflavanon, 3',4'-Dihydroxy-flavanon,  
 Glyoxalhydrat, 1,3,5-Tris(2-Hydroxyethyl)-isocyanursäure, Chinalizarin, 2,4,5-  
 Trihydroxybenzamin.

**III) Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-System (ECS) bei der Herstellung von Ligninlösungen oder Gelen, von entsprechenden Bindern/Klebern und von Holzverbundstoffen**

- 5 Die vorliegende Erfindung hat sich zum Ziel gesetzt, ein Verfahren zur enzymatischen Polymerisation und/oder Modifizierung von Lignin oder ligninenthaltenden Materialien zur Verfügung zu stellen, z.B. zum Einsatz zur Herstellung von Holzzusammensetzungen oder Holzverbundstoffen wie z.B. „fiber board“ aus zerfasertem Holz oder „particle board“ aus Holzspänen oder Holzstücken (→ Spanplatten, Sperrholz, Holzverbundstoff-Balken).

10

- Aus der Literatur und Patentschriften wie z.B. WO 94/01488, WO 93/23477, WO 93/25622 und DE 3037992 C2 ist bekannt, daß Laccasen, Ligninperoxidasen oder Peroxidasen zu diesem Zweck eingesetzt wurden. Allerdings ist der Hauptnachteil die v.a. im Falle von Laccasen und Ligninperoxidasen vorhandene schwierige Herstellung dieser
- 15 Enzyme und die geringen Ausbeuten auch bei gentechnisch veränderten Systemen.

- Es wurde nun völlig überraschend gefunden, daß auch hier das erfindungsgemäße Enzym-Komponenten-System (ECS) eine überlegene Performance zu den im Stand der Technik beschriebenen enzymatischen Systemen zur Polymerisation und/oder Modifizierung von
- 20 Lignin und/oder ligninenthaltenden Materialien zeigt, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente
- 25 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub> -, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub> - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.
- 30 Dabei wird das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System mit Lignin (z.B. Lignosulfonaten und/oder uneingedampfter oder eingedampfter Sulfitablauge und/oder Sulfatlignin
- „Kraftlignin“, z.B. Indulin) und/oder ligninenthaltendem Material zusammengebracht.

- Das Lignin und/oder das ligninenthaltende Material kann entweder bei höheren pH-Werten vorinkubiert werden, d.h. bei pH-Werten über pH 8, bevorzugt bei pH- Werten zwischen 9.5 bis 10.5 bei 20 bis 100 °C (vorzugsweise bei 60 bis 100 °C) und daraufhin der pH-Wert unter pH 7 verschoben werden, je nach optimalem Wirk-pH-Bereich des Enzym-Komponenten-Systems (ECS) oder bei alkalischem Wirkoptimum des Enzym-Komponenten-Systems kann die Zusammengabe von ECS und Lignin und/oder ligninenthaltendem Material sofort ohne Vorbehandlung erfolgen. Die Vorbehandlung oder die Behandlung bei alkalischem pH hat den Zweck die wesentlich leichteren Löslichkeit des Lignins bei diesen höheren pH-Werten auszunützen, was für den erfindungsgemäßen Einsatz von großem Vorteil ist, da dann ohne organische Lösungsmittel gearbeitet werden kann .

- Die beschriebene Zusammengabe von Enzym-Komponenten-System und Lignin und/oder ligninenthaltendem Material dient also hauptsächlich dem Zweck, durch Oxidation eine Aktivierung der Substrate (Polyphenylpropane) herbeizuführen, d.h. durch radikalische Polymerisierung (Modifizierung) das Lignin und/oder das ligninenthaltende Material in ein aktiviertes und aktives Bindemittel zu überführen, welches dann, zusammengebracht mit zu verbindenden ( zu verkle- benden) Holzfasern und/oder Holzteilen, unter Einwirkung von Druck und erhöhter Temperatur zu festen Holzverbundteilen wie die oben genannten Holzwerkstoffe, z.B. „fiber boards“ oder „particle boards“ aushärten kann.
- Der Hauptvorteil liegt in der Verringerung oder Einsparung von normalerweise z.B. bei der Spanplattenherstellung zur „Verleimung“ verwendeten Harnstoff-Formaldehydharzen, die neben toxikologischer Bedenken auch nur bedingt feuchtigkeitsbeständig sind oder Phenolformaldehydharzen, die ein ungünstiges Quellverhalten und lange Presszeiten (auch wiederum neben der toxikologischen Frage) zeigen.
- Durch Zusatz von bestimmten chemischen Polymerisationskatalysatoren wie z.B. Polydiphenylmethyldiisocyanat (PMDI) und andere auch bei der Polymerisation von Lignin in ligninhaltigen Abwässern Verwendung findende Polymerisationskatalysatoren kann die polymerisierende und/oder modifizierende Wirkung des Enzym-Komponenten-Systems weiter verstärkt werden. Solche Stoffe können Phenole, Phenolderivate oder andere phenolische Polycyclen mit einer Reihe von oxidierbaren Hydroxylgruppen sein, die bereits oben aufgeführt wurden/Abwasserbehandlung).

#### IV) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS) als enzymatisches Deinking-System

Unter Deinken, wie es heute noch durchweg als Flotationsdeinken konventionell betrieben wird, versteht man im Prinzip ein zweistufiges Verfahren.

Ziel ist die Entfernung von Druckerschwärze und anderen Farbpartikeln aus Altpapier, wobei als Altpapier meistens die sogenannte „Haushaltssammelware“, die hauptsächlich aus  
5 Zeitungen und Illustrierten besteht, zum Einsatz kommt.

Die erste Behandlungsstufe dient v.a. zur mechanisch/chemischen Entfernung der an den Papierfasern haftenden Farbpartikel. Dies geschieht durch „Zurückführen“ des Papiers in einen einheitlichen Faserbrei, d.h. durch Aufschlagen (Zerkleinern) des Altpapiers in sogenannten Pulpem, Trommeln o.ä. unter gleichzeitiger Zugabe von ablöseverstärkenden  
10 und vergilbungsverhindernden und damit auch bleichenden Chemikalien wie Natronlauge, Fettsäure, Wasserglas und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ).

Dabei dient die Fettsäure als sogenannter Sammler der Farbpartikel in der zweiten Behandlungsstufe, der Flotation, auch als Schaumerzeuger.

Die Flotation wird nach dem Aufschlagen des Altpapiers und einer bestimmten Einwirkzeit  
15 der genannten Chemikalien durch Einblasen von Luft in spezielle Flotationsbehältnisse vorgenommen. Dabei lagern sich die Farbpartikel an die Schaumblasen an und werden mit diesen ausgetragen, d.h. die Farbe wird von den Papierfasern getrennt.

Heute bevorzugt man eine „Fahrweise“ in neutralerem pH-Milieu, was den Einsatz von bestimmten Detergentien anstelle der Fettsäure nötig macht.

20 Aus der Literatur ( WO 91/ 14820, WO 92 20857) ist der Einsatz eines Oxidoreduktase-, bzw. Laccase- Systems bekannt, das sich v.a. durch den Zusatz von speziellen Substanzen auszeichnet, die zum einen hauptsächlich das pH-Wirkoptimum der Laccase von *Trametes versicolor*, welches normalerweise im pH-Bereich von ca. pH 4-5 liegt, in den schwach alkalischen Bereich (pH 8 bis 8.7) verschieben, was für den Einsatz als Deinksystem wegen  
25 der unter pH 7 auftretenden  $CaSO_4$ -Problematik dringend vorgegeben ist, und zum anderen die Laccasewirkung nicht in eine polymerisierende oder rein depolymerisierende Wirkungsweise „hin optimieren“, sondern nur eine gewisse Quellung der Fasern verursachen.

Diese ist aber (wie auch eine der Hauptwirkungen der Natronlauge in den rein chemischen  
30 Deinksystemen) als Ablösemechanismus für die Farbpartikel ein Hauptperformancemerkmal.

Als einziger weiterer Zusatz zu diesem enzymatischen System mit Oxidoreduktasen sind Detergentien zur Schaumerzeugung nötig.

Nahezu alle in Frage kommenden Detergentien haben auch farbablösende Wirkung.

Daneben bewirkt in konventionellen Deinksystemen der Einsatz von Natronlauge und Peroxid Weißesteigerungen durch die Bleichwirkung dieser Chemikalien. Diese Bleichwirkung ist mit dem Enzymsystem nach Stand der Technik systembedingt nicht erreichbar.

- 5 Es wurde nun völlig überraschenderweise gefunden, daß das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System (ECS) durch eine geeignete Auswahl der Komponenten die Effizienz der anderen enzymatischen Deinksysteme v.a. mit Oxidoreduktasen und bei ligninhaltigem Deinkstoff übertrifft und v.a. den Vorteil der Bleichwirkung der rein chemischen Systeme zumindest z.T. kompensiert, d.h. es kann ein System zur Verfügung
- 10 gestellt werden, daß die Möglichkeit des umweltfreundlichen Deinkens bei neutralem pH-Wert, dadurch bessere Nachbleichbarkeit, bessere Stoffeigenschaften etc. bei ähnlich guter Performance, wie sie rein chemische Systeme zeigen, bieten kann, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere
- 15 Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind  $C_6$  bis  $C_{26}$  -, besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$  - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt  $H_2O_2$
- 20 (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können. Dabei kann auch die oben erwähnte Zugabe der speziellen Substanzen, meistens phenolischer Natur und insbesondere mit mehreren Hydroxylgruppen, die auch bei der enzymatischen Abwasserbehandlung und generellen Polymerisationsreaktionen wie bei der
- 25 Erzeugung von Binder/Kleber aus Lignin oder ligninenthaltenden Stoffen v.a. zur Herstellung von Holzverbundstoffen als Polymerisationskatalysatoren Verwendung finden können, eine weitere Verbesserung der Druckfarbablösung bewirken.

30

35

# **V) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) als Oxidationssystem in der organischen Synthese**

In den letzten Jahren wurden verstärkt Enzyme auch für chemische Umsetzungen  
5 in der organischen Synthese verwendet.

In: Preperative Biotransformations, (Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic  
Synthesis, S.M. Roberts; K. Wiggins; G.Casy, J.Wiley & Sons Ltd. 1992/93;

Organic Synthesis With Oxidative Enzymes, H.L. Holland; VCH, 1992;

Biotransformation in Organic Chemistry, K.Faber; Springer Verlag, 1992

10 sind einige Beispiele zusammengestellt, die eine Auswahl von oxidativen Reaktionen  
zeigen, die mit enzymatischen Systemen durchgeführt werden können:

## **1) Hydroxylierungsreaktionen**

- a) Synthese von Alkoholen
- 15 b) Hydroxylierung von Steroiden
- c) Hydroxylierung von Terpenen
- d) Hydroxylierung von Benzolen
- e) Hydroxylierung von Alkanen
- f) Hydroxylierung von aromatischen Verbindungen
- 20 g) Hydroxylierung von Doppelbindungen
- h) Hydroxylierung von unaktivierten Methylgruppen
- i) Dihydroxylierung von aromatischen Verbindungen

## **2) Oxidation von ungesättigten Aliphaten**

- 25 a) Herstellung von Epoxiden
- b) Herstellung von Verbindungen über Epoxierung
- c) Herstellung von Arenoxiden
- d) Herstellung von Phenolen
- e) Herstellung von *cis* Dihydrodiolen

## **3) Baeyer-Villiger Oxidationen**

- 30 a) Baeyer-Villiger Conversion von Steroiden

## **4) Oxidation von Heterocyclen**

- 35 a) Transformation von organischen Sulfiden
- b) Oxidation von Schwefelverbindungen
- c) Oxidation von Stickstoffverbindungen (Bildung von N-Oxiden etc.)
- d) Oxidation von anderen Heteoatomen

## **5) Kohlenstoff-Kohlenstoff Dehydrogenierungen**

- 40 a) Dehydrogenierung von Steroiden

## **6) Andere Oxidationsreaktionen**

- 45 a) Oxidation von Alkoholen und Aldehyden
- b) Oxidation von aromatischen Methylgruppen zu Aldehyden
- c) Oxidative Kummierung von Phenolen



- d) Oxidativer Abbau von Alkylketten ( $\beta$ -Oxidation etc.)
- e) Bildung von Peroxiden oder Perverbindungen
- f) Initiierung von Radikalkettenreaktionen

- 5 Auch hier wurde völlig überraschenderweise gefunden, daß man mit Hilfe des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS) eine Vielzahl von Oxidationsreaktionen aus der oben gezeigten beispielhaften Aufzählung ausführen kann, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere
- 10 Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind  $C_6$  bis  $C_{26}$  -, besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$  - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt  $H_2O_2$
- 15 (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.

- 20 VI) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS) bei der enzymatischen Kohleverflüssigung

Auf diesem Gebiet kann man von folgendem Stand der Technik ausgehen:

Vorläufige Untersuchungen zeigen die prinzipielle Möglichkeit, Braun- oder Steinkohle mit Hilfe von in vivo Behandlung mit z.B. Weißfäulepilzen wie Phanerochaete

- 25 chrysosporium anzugreifen und zu verflüssigen (Inkubationszeit mehrere Wochen/ Bioengineering 4. 92. 8 Jg.).

Die mögliche Struktur von Steinkohle zeigt ein dreidimensionales Netzwerk von polycyclischen, aromatischen Ringsystemen mit einer „gewissen“ Ähnlichkeit zu Ligninstrukturen.

- 30 Als Cofaktor neben den lignolytischen Enzymen nimmt man Chelatsubstanzen (Siderophoren, wie Ammoniumoxalat) und Biotenside an.

- 1) Bisher sind nur wirkungsvolle Kohleverflüssigungssysteme als in vivo Systeme bekannt, (mit ligninabbauenden Organismen v.a. Weißfäulepilzen),
- 35 bzw Systeme mit Oxidoreduktasen plus Mediatoren (Laccase-Mediator-System --> WO 94/29510; WO 96/ 18770.

- 2) Es ist bewiesen, daß grundsätzlich Weißfäulepilze, die in der Lage sind, in vivo Lignin abzubauen, auch in Kultur Kohle verflüssigen können.

- 3) Kohle: Braun- wie Steinkohle sind aus Holz durch chemisch/physikalische „Einwirkungen“ entstanden, haben daher zumindest ähnliche chemische Strukturen, wie sie auch im Lignin vorkommen.
- 4) Bei der Verflüssigung von Kohle durch Weißfäulepilze wird zum einen eine Alkalisierung des pH-Wertes während des Wachstums „auf Kohle“ festgestellt, zum anderen eine Ausscheidung von siderophoren-ähnlichen Chelatbildnern, d.h. bekanntermaßen Stoffe, die eine Verflüssigung von Kohle positiv beeinflussen können.

Hauptgrund für eine ökonomisch sinnvolle technische Umsetzung der Kohleverflüssigung ist die Nachfrage der Industrie nach flüssigen alternativen Energieträgern v.a. unter dem Zukunfts-gesichtspunkt immer geringer werdender Mengen an anderen fossilen Energieträgern wie Öl und Gas bei gleichzeitig zunehmendem Bedarf an Energie, wobei andere Alternativen wie Kernverschmelzung u.a. noch nicht zur Verfügung stehen werden. Es wurde auch hier völlig überraschenderweise gefunden, daß mit Hilfe des erfindungsmäßigen Verfahrens (Enzym-Komponenten-System, ECS) eine Verflüssigung von z.B. Braunkohle mit besserer Performance als mit den herkömmlichen enzymatischen Oxidoreduktasesystemen möglich ist, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind  $C_6$  bis  $C_{26}$  -, besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$  - Fettsäuren) (Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt  $H_2O_2$  (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.

#### VII) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) als Bleichmittel in Waschmitteln

Insbesondere im Niedertemperaturbereich sind die herkömmlichen Bleichsysteme in Haushaltswaschmitteln unbefriedigend. Unterhalb von 60 °C Waschttemperatur muß das Standardbleichmittel  $H_2O_2$ /Natriumperborat/ Natriumpercarbonat durch Zusatz von chemischen Bleichaktivatoren wie TAED und SNOBS aktiviert werden. Ferner wird nach besser biologisch abbaubaren, biokompatiblen und niedrig dosierbaren Bleichsystemen für die Niedrigtemperatur- wäsche gesucht. Während für Eiweiß-Stärke- und Fettlösung sowie

für die Faserbehandlung im Waschvorgang bereits Enzyme im technischen Einsatz sind, steht für die Waschmittelbleiche bisher kein enzymatisches Prinzip zur Verfügung. In der WO 1/05839 wird der Einsatz verschiedener oxidativ wirkender Enzyme (Oxidasen und Peroxidasen) zur Verhinderung des „Dye Transfers“ beschrieben. Peroxidasen sind

5 bekanntermaßen in der Lage, verschiedene Pigmente (3-Hydroxyflavon und Betain durch Meerrettichperoxidase, Carotin durch Peroxidase) zu „entfärben“. Die genannte Patentanmeldung beschreibt die Entfärbung (auch „bleaching“ genannt) von aus der Wäsche abgelösten, in der Flotte vorliegenden Textilfarbstoffen (Umwandlung eines gefärbten Substrates in einen ungefärbten, oxidierten Stoff). Dabei soll das Enzym gegenüber z.B.

10 Hypochlorit, das auch den Farbstoff auf oder in dem Gewebe angreift, den Vorteil haben, nur gelöst vorliegenden Farbstoff zu entfärben, wobei Wasserstoffperoxid oder eine entsprechende Vorstufe oder in situ generiertes Wasserstoffperoxid an der Katalyse der Entfärbung beteiligt sind. Die Enzymreaktion kann teilweise durch Zugabe von zusätzlichem oxidierbaren Enzymsubstrat, z.B. Metallionen wie  $Mn^{++}$ , Halogenidionen wie  $Cl^-$  oder  $Br^-$

15 oder organischen Phenolen, wie p-Hydroxyzimtsäure und 3,4- Dichlorphenol gesteigert werden. Hierbei wird die Bildung von kurzlebigen Radikalen oder von anderen oxidierten Zuständen des zugesetzten Substrats postuliert, die für die Bleiche oder eine andere Modifikation der gefärbten Substanz verantwortlich sind.

In der US 4 077 6768 wird die Verwendung von „iron porphin“, „haemin chlorid“ oder

20 „iron phthalocyanine“ oder Derivaten zusammen mit Wasserstoffperoxid zur Verhinderung des „Dye Transfers“ beschrieben. Diese Stoffe werden aber bei einem Überschuß an Peroxid schnell zerstört weshalb die Wasserstoffperoxid-Bildung kontrolliert ablaufen muß.

Aus WO/126119, WO 94/12620 und WO 94/112621 sind Verfahren bekannt, bei welchen

25 die Aktivität der Peroxidase mittels sogenannter Enhancer-Substanzen gefördert werden. Solche Enhancer-Substanzen werden in WO 94/12620 anhand ihrer Halbwertslebensdauer charakterisiert. Gemäß WO 94/12621 sind Enhancer-Substanzen durch die Formel  $A=N-N=B$  gekennzeichnet, wobei A und B jeweils definierte cyclische Reste sind. Gemäß WO 94/12620 sind Enhancer-Substanzen organische Chemikalien, die mindestens zwei

30 aromatische Ringe enthalten, von denen zumindestens einer mit jeweils definierten Resten substituiert ist.

Alle drei Anmeldungen betreffen „dye transfer inhibition“ und den Einsatz der jeweiligen Enhancer-Substanzen zusammen mit Peroxidasen als Detergenz-Additiv oder Detergenz-Zusammensetzung im Waschmittelbereich. Die Kombination dieser Enhancer-Substanzen

sind auf Peroxidasen beschränkt. Auch aus der WO 92/18687 ist der Einsatz von Gemischen enthaltend Peroxidasen bekannt. Ein spezielles System aus Oxidasen und hierfür geeigneten Substraten sowie Wasserstoffperoxid wird in der DE-OS 42 31 761 beschrieben. Die DE-OS 19 18 729 betrifft ein weiteres spezielles Waschmittelsystem, das aus Glucose

5 und Glucoseoxidase oder aus Stärke,

Amyloglucosidase und Glucoseoxidase (GOD), sowie einem Zusatz aus Hydroxylamin oder Hydroxylaminverbindungen besteht, wobei das Hydroxylamin oder dessen Derivate zur Hemmung der in GOD häufig vorkommender Katalase dient und in keinsten Weise als Mediatorzusatz beschrieben wurde.

10

Die WO 94/ 29425, DE 4445088.5 und WO 97/ 48786 beinhalten schließlich Mehrkomponentenbleichsysteme zur Verwendung mit waschaktiven Substanzen bestehend aus Oxidationskatalysatoren und Oxidationsmitteln sowie aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen NO-, NOH- oder H-NR-OH-haltigen Verbindungen.

15

Nachteilig bei allen bisher bekannten „enzymatisch verstärkten“ Waschmittel-Bleich-Systemen ist, daß die Reinigungs- und Bleichwirkung immer noch nicht zufriedenstellend ist, bzw. die Mediatorsubstanzen in zu großer Menge zugegeben werden müssen und somit umweltmäßig und ökonomisch Probleme auftreten können.

20

Es wurde nun völlig überraschend gefunden, daß das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System (ECS) die Performance der oben genannten Oxidoreduktase-Mediator-Systeme übertrifft und die erwähnten Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-

25 Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4)

(Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub> -, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub> - Fettsäuren)

30 (Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.

**VIII) Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems bei der Bleiche und/oder Entfärbung von Textilgeweben**

- Enzyme werden heute in steigenden Mengen und für verschiedene Applikationen in der Textilindustrie eingesetzt.
- Zum Beispiel spielt der Einsatz von Amylasen beim „Desizing Prozeß“ eine große Rolle, wodurch der Einsatz von starken Säuren, Laugen oder Oxidationsmitteln verhindert werden kann.
- Ebenso werden Cellulasen für das sogenannte Bio-polishing wie auch beim sogenannten Bio-stoning eingesetzt, einem Verfahren, das meistens zusammen mit dem konventionellen Prozeß des Stone-washings mit Bimssteinen beim Behandeln von Denim-Jeansstoffen zur Entfernung des Indigofarbstoffes Anwendung findet.
- WO 94/29510, WO/ 96/18770, DE 196 12 194 A1 und DE 44 45 088 A1 beschreiben Verfahren zur enzymatischen Delignifizierung, bei dem Enzyme zusammen mit Mediatoren eingesetzt werden. Als Mediatoren werden allgemein Verbindungen mit der Struktur NO-, NOH-, oder HNROH offenbart.
- Allerdings sind diese Systeme auf den Einsatz in der Zellstoffbleiche beschränkt. Da die Mechanismen, die einer ligninentfernenden Zellstoffbleiche und um einen solchen Vorgang handelt es sich hier, zu Grunde liegen, völlig verschieden zu einer Entfärbung, Entfernung und/oder „Zerstörung“ von Denimfarbstoffen im Jeansbereich wie v.a. Indigofarbstoffe etc. sind, ist es völlig überraschend, daß eine Reihe von Stoffen des genannten NO-,NOH-, HNROH-typs auch für diesen Anwendungszweck geeignet ist.
- In WO 97/06244 sind Systeme für die Bleiche von Zellstoff, der „dye transfer inhibition“ and der Bleiche von Flecken bei der Waschmittelanwendung, die mit Enzymen (Peroxidasen, Laccasen) und enzymverstärkenden (hetero)-aromatischen Verbindungen wie Nitrosoverbindungen etc. arbeiten, beschrieben.
- Allerdings ist hier ebenso wie in den Patenten WO 94/12619, WO 94/12620 und WO 94/12621 nur der oben beschriebene Einsatz vorgesehen.
- Auch die Mechanismen der Entfärbung von Flecken bei der Waschmittelbleiche bzw. „dye transfer inhibition“ sind völlig andere als die, die bei der Entfärbung, Entfernung und/oder „Zerstörung“ von Indigo-Farbstoffen, z.B. bei der Denimbehandlung zu Grunde liegen.

Deshalb ist es auch hier völlig überraschend, daß eine Reihe von Stoffen des genannten NO-, NOH-, HNROH-typs auch für diesen Anwendungszweck geeignet ist.

- Aus den genannten WO 94/12619, WO 94/12620 und WO 94/12621 sind Verfahren  
 5 bekannt, bei welchen die Aktivität der Peroxidase mittels sogenannter Enhancer-Substanzen gefördert werden. Solche Enhancer-Substanzen werden in WO 94/12620 anhand ihrer Halbwertslebensdauer charakterisiert. Gemäß WO 94/12621 sind Enhancer-Substanzen durch die Formel  $A=N-N=B$  gekennzeichnet, wobei A und B jeweils definierte cyclische Reste sind. Gemäß WO 94/12621 sind  
 10 Enhancer-Substanzen organische Chemikalien, die mindestens zwei aromatische Ringe enthalten, von denen zumindestens einer mit jeweils definierten Resten substituiert ist.

- Alle drei Anmeldungen betreffen ( wie bereits erwähnt) „dye transfer inhibition“ und den Einsatz der jeweiligen Enhancer-Substanzen zusammen mit Peroxidasen als  
 15 Detergenz-Additiv oder Detergenz-Zusammensetzung im Waschmittelbereich bzw. auch Zellstoffbleichbereich. Die Kombination dieser Enhancer-Substanzen sind auf Peroxidasen beschränkt.

- Weiterhin werden neuerdings Oxidoreduktasen, hauptsächlich Laccasen, aber auch  
 20 Peroxidasen zur Behandlung von hauptsächlich Jeans Denim eingesetzt.

- Aus der Patentanmeldung WO 96/ 12846 ist bekannt, daß Laccase bzw. auch Peroxidase + bestimmte Enhancersubstanzen, v.a. Phenothiazin- bzw. Phenoxazin-Abkömmlinge, für zwei Applikationsformen bei der Behandlung von  
 25 celluloseenthaltenden Geweben wie Baumwolle, Viskose, Rayon, (Kunstseide) Ramie, Leinen, Tencel, Seide oder Mischungen dieser Gewebe oder Mischungen dieser Gewebe mit Synthefasern wie z.B. Mischungen von Baumwolle und Spandex (Stretch-Denim) , hauptsächlich aber Denimstoffen (hauptsächlich Jeansware) eingesetzt werden:  
 30 Zum einen soll das System (Oxidoreduktasen + Enhancersubstanzen) zur Bleiche von Denim anstatt der üblichen Hypochloritbleiche, üblicherweise nach Stone-washing-Vorbehandlung, eingesetzt werden, wobei diese enzymatische Behandlung nur zu einem teilweisen Ersatz von Hypochlorit führt, da das gewünschte Bleichergebnis nicht erreicht werden kann.

Zum anderen kann das System zusammen mit Cellulase beim Stone-washing anstelle der üblichen mechanischen Behandlung durch Himssteine eingesetzt werden, was die Performance von „Nur-Cellulase-Behandlung“ verbessern soll.

Die Hauptnachteile des in WO/ 96/12846 beschriebenen Systems sind unter anderem folgende:

- 1) Es wird muß Laccase in erheblichen Mengen eingesetzt werden ( ca. 10 IU/ g Denim), um das gewünschte Ergebnis zu erzielen.
- 2) Die optimale Behandlungsdauer ist z. T. 2-3 Stunden.
- 3) Der bevorzugte Mediator (hier Phenothiazin-10-propionsäure) muß in ca. 2 bis ca. 14 mg pro g Denim eingesetzt werden, was erhebliche Kosten verursacht.
- 4) Es muß in Puffersystemen (ca. 0.1 Mol/L) gearbeitet werden, da ansonsten keine Performance erreicht werden kann, was das System ebenso erheblich verteuert. Dies ist z.B. beim erfindungsgemäßen System nicht nötig.
- 5) Durch die Färbung der Enhancerkomponente (langlebiges Radikal) wird eine „Verbräunung“ des Gewebes hervorgerufen.

Der generelle Hauptvorteil eines Laccase- und/ oder Oxidoreduktasesystems enzymwirkungsverstärkenden Verbindungen (Enhancern, Mediatoren etc.) beim Einsatz in der oben beschriebenen Behandlung von Textilien (z.B. Jeansstoffe), bei einem optimaleren System als beim Stand der Technik vorhanden, liegt darin, daß man Fashion looks erzielen kann, die eine übliche Hypochlorit-Bleiche nicht ermöglicht.

Die normalerweise bei Jeans-Denim benutzten Farbstoffe sind VAT Farbstoffe wie Indigo, oder Indigoabkömmlinge wie z.B. Thioindigo, aber auch sogenannte Sulfur dyes.

Durch den Einsatz solcher spezieller enzymatischer Systeme ist es möglich (durch die hohe Spezifität solcher Systeme) bei Mischfärbensystemen wie z.B. Indigo- und Sulfur dye nur den Indigofarbstoff zu entfärben, während der Sulfur dye nicht oxidiert wird. Dies führt in Abhängigkeit von der benutzten enzymwirkungsverstärkenden Verbindung zu nahezu jeder gewünschten Färbung des Gewebes (z.B. Grautöne etc.), die oftmals erwünscht ist.

Als zusätzlicher Vorteil ist zu sehen, daß die enzymatische Behandlung wesentlich schonender abläuft als die Bleiche mit Hypochlorit, was zu geringeren Faserschädigungen führt.

Beim Stone-wash-Prozeß ist v.a. der ökologische Effekt von Bedeutung (auch neben der geringeren Faserschädigung durch die Enzyme), wenn man z.B. bedenkt, daß pro kg Jeans-Denim ca. 1 kg Steinschlamm durch diesen rein mechanischen Prozeß entsteht.

- 5 Wie im Stand der Technik dargelegt, besteht in der Textilindustrie, hauptsächlich bei gefärbten Geweben (wie. z. B. Jeans-Denim) ein großer Bedarf an alternativen Bleichverfahren (zur konventionellen Hypochloritbleiche) und/oder Behandlungsverfahren als Alternative zum Stone-washing zur Erzielung des sogenannten „bleached looks“, nicht zuletzt wegen der auch hier bestehenden
- 10 Umweltproblematik.

Die vorliegende Erfindung hat sich zum Ziel gesetzt, die Nachteile der konventionellen Prozesse: Stone- washing / Bleiche nach Stone-washing oder generelle Bleiche von gefärbten und/oder ungefärbten Textilgeweben: v.a.

- 15 Umweltproblematik und Faserschädigungen und auch die Nachteile der bekannten Oxidoreduktase/Enhancer-Systeme (z.B. auch NO-Radikalbildungen etc.) zu minimieren bzw. zu beheben.
- s wurde nun völlig überraschend gefunden, daß das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System (ECS) die Performance der oben genannten Oxidoreduktase-Mediator-Systeme übertrifft und die erwähnten Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist, d.h. die obige Aufgabe wird dadurch gelöst, indem ein erfindungsmäßiges Enzym-Komponenten-System (ECS) zur Verfügung gestellt wird, welches eine oder mehrere Lipasen, bevorzugt aus der Gruppe der Triacylglycerinlipasen (3.1.1.3) oder eine oder mehrere Amidasen, bevorzugt
- 20 aus der Gruppe der Amidasen (3.5.1.4) (Systemkomponente 1), enthält, welche aus einer oder mehreren vorhandenen Fettsäuren (bevorzugt sind  $C_6$  bis  $C_{26}$  -, besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$  - Fettsäuren) ( Systemkomponente 2), sowie unter Vorhandensein von Oxidationsmitteln wie Peroxiden, bevorzugt  $H_2O_2$  ( Systemkomponente 3) über die Bildung von Persäuren aus als weitere Komponente vorhandenen Ketonen
- 30 (Systemkomponente 4) z.B. Dioxirane produzieren können.



**Beschreibung der Systemkomponenten des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) im einzelnen:**

**5 Systemkomponente 1 (Lipasen u.a. Enzyme) des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS)**

Bevorzugt sind Enzyme der Gruppe 3 (Hydrolasen) 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.7 gemäß Internationaler Enzym-Nomenklatur: Committee of the International Union  
 10 of Biochemistry and Molecular Biology (Enzyme Nomenclature, Academic Press, Inc., 1992, S. 306 -337).

Bevorzugt sind Enzyme, die auf Esterbindungen wirken (3.1), insbesondere diejenigen, die auf Carboxylester wirken (3.1.1):

**15 A) Carboxylester-Hydrolasen (3.1.1)**

- 3.1.1.1 Carboxylesterase
- 3.1.1.2 Arylesterase
- 3.1.1.3 Triacylglycerinlipase
- 20 3.1.1.4 Phospholipase A<sub>2</sub>
- 3.1.1.5 Lysophospholipase
- 3.1.1.6 Acetylesterase
- 3.1.1.7 Acetylchlorinesterase
- 3.1.1.8 Cholinesterase
- 25 3.1.1.10 Tropinesterase
- 3.1.1.11 Pectinesterase
- 3.1.1.13 Sterolesterase
- 3.1.1.14 Chlorophyllase
- 3.1.1.15 L-Arabinonolactonase
- 30 3.1.1.17 Gluconolactonase
- 3.1.1.19 Uronolactonase
- 3.1.1.20 Tannase
- 3.1.1.21 Retinyl-palmitate esterase
- 3.1.1.22 Hydroxybutyrate-dimer hydrolase
- 35 3.1.1.23 Acylglycerinlipase
- 3.1.1.24 3-Oxadipate- enol-Lactonase
- 3.1.1.25 1,4-Lactonase
- 3.1.1.26 Galactolipase
- 3.1.1.27 4-Pyrodoxolactonase
- 40 3.1.1.28 Acylcarnitine hydrolase
- 3.1.1.30 D-Arabinonolactonase
- 3.1.1.31 6-Phosphogluconolactonase
- 3.1.1.32 Phospholipase A<sub>1</sub>
- 3.1.1.33 6-Acetylglucose deacetylase
- 45 3.1.1.34 Lipoproteinlipase

- 3.1.1.35 Dihydrocoumarin hydrolase
- 3.1.1.36 Limonin-D-ring-lactonase
- 3.1.1.37 Steroid-lactonase
- 3.1.1.38 Triacetate-lactonase
- 5 3.1.1.39 Actinomycin lactonase
- 3.1.1.40 Orsellinate-depside hydrolase
- 3.1.1.41 Cephalosporin-C deacetylase
- 3.1.1.42 Chlorogenate hydrolase
- 3.1.1.43  $\alpha$ -Amino-acid esterase
- 10 3.1.1.44 4-Methyloxaloacetate esterase
- 3.1.1.45 Carboxymethylenebutenolidase
- 3.1.1.46 Deoxylimonate A-ring-lactonase
- 3.1.1.47 1-Alkyl-2-acetyl-glycerophosphocholine esterase
- 3.1.1.48 Fusarinine-C ornithinesterase
- 15 3.1.1.49 Sinapine esterase
- 3.1.1.50 Wax-ester hydrolase
- 3.1.1.51 Phorbol-diester hydrolase
- 3.1.1.52 Phosphatidylinositol deacylase
- 3.1.1.53 Sialate O-acetylcylase
- 20 3.1.1.54 Acetoxybutynylbithiophene deacetylase
- 3.1.1.55 Acetylsalicylate deacetylase
- 3.1.1.56 Methylumbelliferyl-acetate deacetylase
- 3.1.1.57 2-Pyrone-4,6-dicarboxylate lactonase
- 3.1.1.58 N-Acetylgalactosaminoglycan deacetylase
- 25 3.1.1.59 Juvenile-hormone esterase
- 3.1.1.60 Bis (2-ethylhexyl)phthalate esterase
- 3.1.1.61 Protein-glutamate methylesterase
- 3.1.1.63 11-cis-Retynil-palmitate hydrolase
- 3.1.1.64 all-trans-Retynil-palmitate hydrolase
- 30 3.1.1.65 L-Rhamnono-1,4-lactonase
- 3.1.1.66 5- (3,4-Diacetoxybut-)ynyl 2,2'-bithiophene deacetylase
- 3.1.1.67 Fatty-acal-ethyl-ester synthase
- 3.1.1.68 Xylono-1,4-lactonase
- 3.1.1.69 N-Acetylglucosaminylphosphatidylinositol deacetylase
- 35 3.1.1.70 Cetraxate benzylesterase

ebenso bevorzugt sind:

#### B) Thiolesterhydrolasen (3.1.2)

- 40 3.1.2.6 Hydroxyacylglutathione hydrolase
- 3.1.2.7 Glutathione thiolesterase
- 3.1.2.12 S-Formylglutathione hydrolase
- 3.1.2.13 S-Succinylglutathione hydrolase
- 45 3.1.2.14 Oleoyl-(acyl-carrier-protein) hydrolase
- 3.1.2.15 Ubiquitin thiolesterase
- 3.1.2.16 (Citrate-(pro-3S)-lyase) thiolesterase

50 Ebenso bevorzugt sind:

**C) Phosphor-Monester-Hydrolasen (Phosphatasen) (3.1.3)**

- 3.1.3.1 Alkaline phosphatase
- 3.1.3.2 Acid phosphatase
- 5 3.1.3.3 Phosphoserine phosphatase
- 3.1.3.4 Phosphatidate phosphatase
- 3.1.3.8 3-Phytase
- 3.1.3.9 Glucose-6-phosphatase
- 3.1.3.10 Glucose-1-phosphatase
- 10 3.1.3.11 Fructose-bisphosphatase
- 3.1.3.12 Trehalose-phosphatase
- 3.1.3.13 Bisphosphoglycerate phosphatase
- 3.1.3.14 Methylphosphothioglycerate phosphatase
- 3.1.3.15 Histidinol phosphatase
- 15 3.1.3.16 Phosphoprotein phosphatase
- 3.1.3.17 (Phosphorylase) phosphatase
- 3.1.3.18 Phosphoglycolate phosphatase
- 3.1.3.19 Glycerol-2-phosphatase
- 3.1.3.20 Phosphoglycerate phosphatase
- 20 3.1.3.21 Glycerol-1-phosphatase
- 3.1.3.22 Mannitol-1-phosphatase
- 3.1.3.23 Sugar phosphatase
- 3.1.3.24 Sucrose phosphatase
- 3.1.3.25 *myo*-Inositol-1 (or 4) -monophosphatase
- 25 3.1.3.26 6-Phytase
- 3.1.3.27 Phosphatidylglycerophosphatase
- 3.1.3.36 Phosphatidylinositol-bisphosphatase
- 3.1.3.37 Sedoheptulose-bisphosphatase
- 3.1.3.38 3-Phosphoglycerate phosphatase
- 30 3.1.3.39 Streptomycin-6-phosphatase
- 3.1.3.40 Guanidinodeoxy-*scyllo*-inositol-4-phosphatase
- 3.1.3.41 4-Nitrophenylphosphatase
- 3.1.3.42 (Glycogen-synthase-D)phosphatase
- 3.1.3.43 (Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) )-phosphatase
- 35 3.1.3.45 3-Deoxy-*manno*-octulosonate-8-phosphatase
- 3.1.3.46 Fructose-2,6-bisphosphate 2 phosphatase
- 3.1.3.48 Protein-tyrosine-phosphatase
- 3.1.3.49 (Pyruvate kinase)-phosphatase
- 3.1.3.50 Sorbitol-6-phosphatase
- 40 3.1.3.51 Dolichyl-phosphatase
- 3.1.3.52 (3-Methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide))-phosphatase
- 3.1.3.53 Myosin-light-chain-phosphatase
- 3.1.3.54 Fructose-2,6-bisphosphate 6-phosphatase
- 3.1.3.55 Caldesmon-phosphatase
- 45 3.1.3.56 Inositol-1,4,5-trisphosphate 5 phosphatase
- 3.1.3.57 Inositol-1,4-bisphosphate 1-phosphatase
- 3.1.3.58 Sugar-terminal-phosphatase
- 3.1.3.59 Alkylacetylgllycerophosphatase
- 3.1.3.60 Phosphoenolpyruvate phosphatase
- 50 3.1.3.61 Inositol-1,4,5-trisphosphate 1- phosphatase
- 3.1.3.62 Inositol-1,3,4,5- tetrakisphosphate 3-phosphatase

- 3.1.3.63 2-Carboxy-D-arabinitol-1-phosphatase
- 3.1.3.64 Phosphatidylinositol-3-phosphatase
- 3.1.3.65 Inositol-1,3-bisphosphate 3-phosphatase
- 3.1.3.66 Inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase

5

Ebenso bevorzugt sind:

#### **D) Phosphorsäure Diester Hydrolasen (3.1.4)**

- 10 3.1.4.1 Phosphodiesterase I
- 3.1.4.2 Glycerophosphocholine phosphodiesterase
- 3.1.4.3 Phospholipase C
- 3.1.4.4 Phospholipase D
- 3.1.4.10 1-Phosphatidylinositol phosphodiesterase
- 15 3.1.4.11 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase
- 3.1.4.12 Sphingomyelin phosphodiesterase
- 3.1.4.13 Serine-ethanolaminephosphate phosphodiesterase
- 3.1.4.14 (Acyl-carrier-protein) phosphodiesterase
- 3.1.4.36 1,2-Cyclic-inositol-phosphate phosphodiesterase
- 20 3.1.4.38 Glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase
- 3.1.4.39 Alkylglycerophosphoethanolamine phosphodiesterase
- 3.1.4.40 CMP-N-acylneuraminate phosphodiesterase
- 3.1.4.41 Sphingomyelin phosphodiesterase D
- 3.1.4.42 Glycerol-1,2-cyclic-phosphate 2-phosphodiesterase
- 25 3.1.4.43 Glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase
- 3.1.4.44 Glycerophosphoinositol glycerophosphodiesterase
- 3.1.4.45 N-Acetylglucosamine-1-phosphodiesterase
- 3.1.4.46 Glycerophosphodiester phosphodiesterase
- 3.1.4.47 Variant-surface-glycoprotein phospholipase C
- 30 3.1.4.48 Dolichyl-phosphate-glucose phosphodiesterase
- 3.1.4.49 Dolichyl-phosphate-mannose phosphodiesterase
- 3.1.4.50 Glycoprotein phospholipase D
- 3.1.4.51 Glucose-1-phospho-D-mannosylglycoprotein phosphodiesterase

35

Ebenso bevorzugt sind:

#### **E) Diphosphorsäure-Monoester-Hydrolasen (3.1.7)**

40

- 3.1.7.1 Prenyl-pyrophosphatase
- 3.1.7.3 Monoterpenyl-pyrophosphatase

45 davon ganz besonders bevorzugt sind Enzyme der Gruppe 3.1.1.3, Lipasen

(Triacylglycerin Lipasen, Triglycerinacylhydrolasen)

aus Organismen wie *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida lipolytica*, *Candida cylindracea*, *Candida spec.*, *Geotrichum candidum*, *Humicola lanuginosa*, *Penicillium cambertii*, *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus spec.*, *Mucor javanicus*, *Mucor mehei*,

Rhizopus arrhizus, Rhizopus niveus, Rhizopus delamar, Rhizopus spec. Chromobacterium viscosum, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas spec., aus Weizenkeimlingen oder Pankreas (Schwein oder andere Quellen).

5

Als weitere Enzyme werden solche, die Kohlenstoff/Stickstoffbindungen (C/N) spalten können (andere als Peptidbindungen), eingesetzt (3.5)

Zu dieser Subklasse gehören Enzyme, die Amide, Amidine, und andere C/N-Bindungen  
 10 spalten können. Besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse: 3. 5. 1, die auf lineare Amide wirken,  
 der Klasse: 3.5.2, die auf cyclische Amide wirken, der Klasse 3.5.3, die auf lineare Amidine wirken, der Klasse 3.5.4, die auf cyclische Amidine wirken, der Klasse 3.5.5, die auf Nitrile wirken und der Klasse 3.5.99, die auf andere Verbindungen wirken.

15

Besonders bevorzugt sind die Enzyme der Klasse 3.5.1, die auf lineare Amide wirken, wie:

- 3.5.1.1 Asparaginase
- 3.5.1.2 Glutaminase
- 20 3.5.1.3  $\omega$ -Amidase
- 3.5.1.4 Amidase
- 3.5.1.6 Urease
- 3.5.1.7  $\beta$ -Ureidopropionase
- 3.5.1.7 Ureidosuccinase
- 25 3.5.1.8 Formylaspartat Deformylase
- 3.5.1.9 Arylformamidase
- 3.5.1.10 Formyltetrahydrofolat Deformylase
- 3.5.1.11 Penicillin Amidase
- 3.5.1.12 Biotinidase
- 30 3.5.1.13 Aryl-acylamidase
- 3.5.1.14 Aminoacylase
- 3.5.1.15 Aspartoacylase
- 3.5.1.16 Acetylornithin Deacetylase
- 3.5.1.17 Acyl-Lysin-Deacylase
- 35 3.5.1.19 Nicotinamidase
- 3.5.1.20 Citrullinase
- 3.5.1.22 Pantothenase
- 3.5.1.30 5-Aminopentanamidase
- 3.5.1.31 Formylmethionin Deformylase
- 40 3.5.1.32 Hippurate Hydrolase
- 3.5.1.39 Alkylamidase
- 3.5.1.40 Acylagmatin Amidase
- 3.5.1.41 Chitin deacetylase
- 3.5.1.42 Nicotinamid-Nucleotid Amidase
- 45 3.5.1.49 Formamidase
- 3.5.1.50 Pentanamidase

- 3.5.1.55 Long-chain-fatty-acyl-glutamate Deacylase
- 3.5.1.56 N,N-Dimethylformamidase
- 3.5.1.57 Tryptophanamidase
- 3.5.1.58 N-Benzoyloxycarbonylglycin Hydrolase
- 5 3.5.1.59 N-Carbamoylsarcosin Amidase
- 3.5.1.72 D-Benzoylarginin-4-Nitroanilid Amidase
- 3.5.1.73 Carnitinamidase
- 3.5.1.75 Urethanase

- 10 Ebenso besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse 3.5.2, die auf cyclische Amide wirken, wie:

- 3.5.2.1 Barbiturase
- 3.5.2.2 Dihydropyrimidase
- 15 3.5.2.3 Dihydroorotase
- 3.5.2.4 Carboxymethylhydantoinase
- 3.5.2.5 Allantoinase
- 3.5.2.6  $\beta$ -Lactamase
- 3.5.2.10 Creatininase

- 20 Ebenso besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse 3.5.3, die auf lineare Amidine wirken, wie:

- 3.5.3.1 Arginase
- 25 3.5.3.3 Creatinase
- 3.5.3.4 Allantoicase
- 3.5.3.6 Arginine Deiminase
- 3.5.3.9 Allantoat Deiminase
- 3.5.3.10 D-Arginase
- 30 3.5.3.14 Amidinoaspartase
- 3.5.3.15 Protein-arginin Deiminase

- 35 Ebenso besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse 3.5.4, die auf cyclische Amidine wirken, wie:

- 3.5.4.8 Aminoimidazolase
- 40 3.5.4.21 Creatinin Deaminase

Bevorzugt sind auch Enzyme der Klasse 3.5.99, die auf andere Verbindungen wirken, wie:

- 45 3.5.99.1 Riboflavinase
- 3.5.99.2 Thiaminase

Insbesondere besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse 3.5.5.1 Nitrilase  
(3.5.5.2 - 3.5.5.6, andere Nitrilasen)

Ebenso besonders bevorzugt sind Enzyme der Klasse 3.5.1, hier insbesondere der Klasse  
5 3.5.1.4 Amidasen.

Systemkomponente 2 des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS)

Fettsäuren, die im erfindungsgemäßen Verfahren als Persäurequelle eingesetzt werden,  
10 sind z.B.:

1) gesättigte Fettsäuren

	Butansäure	(Buttersäure)
15	Pentansäure	(Valeriansäure)
	Hexansäure	(Capronsäure)
	Heptansäure	(Önanthsäure)
	Octansäure	(Caprylsäure)
	Nonansäure	(Pelargonsäure)
20	Decansäure	(Caprinsäure)
	Undecansäure	
	Dodecansäure	(Laurinsäure)
	Tridecansäure	
	Tetradecansäure	(Myristinsäure)
25	Pentadecansäure	
	Hexadecansäure	(Palmitinsäure)
	Heptadecansäure	
	Octadecansäure	(Stearinsäure)
	Nonadecansäure	
30	Eicosansäure	(Arachinsäure)
	Heneicosansäure	
	Docosansäure	(Behensäure)
	Tricosansäure	
	Tetracosansäure	(Lignocerinsäure)
35	Pentacosansäure	
	Hexacosansäure	(Cerotinsäure)
	Octacosansäure	
	Triacotansäure	(Melissinsäure)

40 2) ungesättigten Fettsäuren

	10-Udecensäure	
	9c-Dodecensäure	(Lauroleinsäure)
	9c-Tetradecensäure	(Myristoleinsäure)
45	9c-Hexadecensäure	(Palmitoleinsäure)
	6c-Octadecensäure	(Petroselinsäure)
	6t-Octoddecensäure	(Petroselaidinsäure)
	9c-Octoddecensäure	(Ölsäure)

	9t-Octadecensäure	(Elaidinsäure)
	9c,12c-Octadecadiensäure	(Linolsäure)
	9t,12t-Octadecadiensäure	(Linolaidinsäure)
	9c,12c,15c-Octadecatriensäure	(Linolensäure)
5	9t,11t,13t-Octadecatriensäure	( $\alpha$ -Eläostearinsäure)
	9c,11t,13t-Octadecatriensäure	( $\beta$ -Eläostearinsäure)
	9c-Eicosensäure	(Gadoleinsäure)
	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	(Arachidonsäure)
	13c-Docosensäure	(Erucasäure)
10	13t-Docosensäure	(Brassidinsäure)
	4,8,12,15,19-Docosapentaensäure	(Clupanodonsäure)

### 3) mehrfach ungesättigte Fettsäuren

15	9,12-Octadecadiensäure	(Linolsäure)
	9,12,15-Octadecatriensäure	(Linolensäure)
	5,9,12-Octadecatriensäure	
	9,11,13-Octadecatriensäure	(Eläostearinsäure)
20	9,11,13,15-Octadecatetraensäure	(Parinarsäure)
	5,11,14-Eicostriensäure	
	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	(Arachidonsäure)
	4,8,12,15,18-Eicosapentaensäure	
	4,8,12,15,19-Decosapentaensäure	(Clupanodonsäure)
25	4,8,12,15,18,21-Tetracosahexaensäure	(Nisinsäure)

Besonders bevorzugt sind die Tetradecansäure (Myristinsäure) und die Dodecansäure (Laurinsäure).

30

### Systemkomponente 3 (Oxidationsmittel : Peroxide oder Perverbindungen) des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten- Systems (ECS)

35

Als Oxidationsmittel werden im erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-System

Peroxid ( $H_2O_2$ ), organische Peroxide, und Perverbindungen, wie:

Perborate, Persulphate, Percarbonate, Perphosphate, Percarbamide, Perchlorate u. a. bevorzugt.

40

Als organische Peroxide werden bevorzugt z.B.:

3-Chlorperoxybenzoesäure, Monoperoxyphthalsäure- Mg-Salz, Di-tert.-butylperoxid, Cumolhydroperoxid, Lauroylperoxid, Chloroperoxybenzoesäure, Dicumylperoxid, Ethymethyl-ke-ton-peroxid, Benzoylperoxid, Diperoxidodecandionsäure-Na-Salz, u. a.



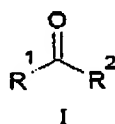
- Ebenso können Kombinationen von auch in Waschmitteln benutzen Bleichaktivatoren wie TAED (Tetraacetylenhydramin), TAGU (Tetraacetylglucuronil) und iso-NOBS (Natrium-p-iso-nonanoyloxybenzolsulfonat) u.a. neben der Lipase-katalysierten Persäureherstellung zusammen mit Perverbindungen wie Perborate, Percarbonate etc. als weitere
- 5 Persäure-Generierungs-Quelle dienen.
- Ebenso können die oben genannten Perverbindungen wie auch z.B. Glukose + GOD als  $H_2O_2$ -generierende Systeme, für die entsprechende Lipase- Wirkung Verwendung finden.
- Ebenso werden Substanzen wie Nitrilamine bzw. Dicyandiamine, bzw. Ionen von Metallen, wie z.B.  $Mo^{6+}$ ,  $V^{5+}$  und  $W^{6+}$  zusammen mit Peroxiden wie z.B.  $H_2O_2$  eingesetzt.

10

**Systemkomponente 4 (Ketone) des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS)**

Besonders bevorzugt sind Carbonylverbindungen der allgemeinen Formel I.

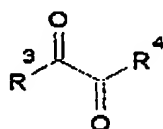
15



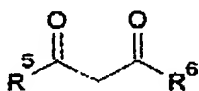
- Die Reste  $R^1$  und  $R^2$  können gleich oder ungleich sein und aliphatische oder aromatische
- 20 Gruppen darstellen. Weiterhin können die Reste  $R^1$  und  $R^2$  einen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel enthalten kann.

Besonders bevorzugt sind 1,2- Diketone (Formel II) und 1,3-Diketone (Formel III) bzw. Polyketone (Polyketide) sowie die tautomeren Enole (Formel IV),

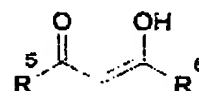
25



II



III



IV

- wobei die Reste  $R^3$  bis  $R^6$  jeweils wieder gleich oder ungleich sein können und aliphatische
- 30 oder aromatische Gruppen darstellen können. Weiterhin können die Reste  $R^3$  und  $R^4$  und die Reste  $R^5$  und  $R^6$  einen gemeinsamen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel enthalten kann.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Dabei ist die Möglichkeit der Tautomerisierung bzw. der Ausbildung eines Resonanzhybrides von besonderer Bedeutung.

Neben allgemeinen Carbonylverbindungen sind besonders bevorzugt Ketone wie allgemein Hydroxyketone,  $\alpha,\beta$  - ungesättigte Ketone, Oxicarbonsäuren, Chinone und Halogenketone.

5 Daraus weiterhin besonders bevorzugt sind:

- Aceton, Methylethylketon, Diethylketon, Methyl-n-butylketon, Methyl-isobutylketon, Cyclohexanon, Cyclopentanon, 2-Methylcyclohexanon, 3-Methylcyclohexanon, 4-Methylcyclohexanon, Dihydroxyaceton, Diacetyl (Monohydrazon), Diacetyl
- 10 (Dihydrazon), Acetophenon, p-Hydroxyacetophenon, 1-Phenylbutan-3-on, Pentan-3-on, Heptan-4-on, Nonan-2-on, Cycloheptanon, Cyclooctanon, Cyclodecanon, Cyclododecanon, Cyclohexanon, 2-Methylcyclohexanon, 3-Methylcyclohexanon, 4-Methylcyclohexanon, Cyclopentanon, 2-Methylcyclopentanon, 3-Methylcyclopentanon, Dimethylketon, Ethylpropylketon, Methylnamylketon, Acethylaceton, Pinakolin, Methyl-isopropylketon,
- 15 Methyl-isoamylketon, Ethylamylketon, Diisopropylketon, Diisobutylketon, Methyl-vinylketon, Methyl-isopropenylketon, Mesityloxid, Isophoron, Hydroxyaceton, Methoxyaceton, 2,3-Pentandion, 2,3-Hexandion, Phenylaceton, Propiophenon, Benzophenon, Benzoin, Benzil, 4,4'-Dimethoxybenzil, 4'-Methoxyacetophenon, 3'-Methoxyacetophenon, O-Ethylbenzoin, (2-Methoxyphenyl)-aceton, (4-Methoxyphenyl)-
- 20 aceton, Methoxy-2-propanon, Glyoxylsäure, Benzylglyoxylat, Benzylaceton, Benzylmethylketon, Cyclohexylmethylketon, 2-Decanon, Dicyclohexylketon, Diethylketon, Diisopropylketon, 3,3-Dimethyl-2-butanon, Isobutylmethylketon, Isopropylmethylketon, 2-Methyl-3-heptanon, 5-Methyl-3-heptanon, 6-Methyl-5-hepten-2-on, 5-Methyl-2-hexanon, 2-Nonaon, 3-Nonaon, 5-Nonaon, 2-Octanon, 3-Octanon, 2-Undecanon, 1,3-Dichloraceton,
- 25 1-Hydroxy-2-butanon, 3-Hydroxy-2-butanon, 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon, 2-Adamantanon, Anthron, Bicyclo(3.2.0)hept-2-en-6-on, *cis*-Bicyclo(3.3.0)octan-3,7-dion, (1S)-(-)-Campher, p-Chloranil, Cyclobutanon, Cyclododecanon, 1,3-Cyclohexandion, 1,4-Cyclohexandionmonoethylenketal, Dibenzosuberone, Ethyl-4-oxocyclohexancarboxylat, Fluoren-9-on, 1,3-Indandion, Methylcyclohexanon, Phenylcyclohexanon, 4-
- 30 Propylcyclohexanon, 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthalimon, 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthalimon, 3,3,5-Trimethylcyclohexanon, 3-Acetoxy-2-cyclohexen-1-on, Benzylidenaceton, (R)-(-)-Carvon, (S)-(-)-Carvon, Curcumin, 2-Cyclohexen-1-on, 2,3-Diphenyl-2-cyclopropen-1-on, 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on, Isophoron,  $\alpha$ -

- Jonon,  $\beta$ -Jonon, 3-Methoxy-2-cyclohexen-1-on, 3-Methyl-2-cyclopenten-1-on, 3-Methyl-3-penten-2-on, Methylvinylketon, (R)-(+)-Pulegon, Tetraphenyl-2,4-cyclopentadien-1-on, 2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dion, 2-Acetylbenzoesäure, 1-Acetylnaphthalin, 2-Acetylnaphthalin, 3'-Aminoacetophenon, 4'-Aminoacetophenon, 4'-cyclohexylacetophenon, 3',4'-Diacetoxyacetophenon, Diacetylbenzol, 2',4'-Dihydroxyacetophenon, 2',5'-Dihydroxyacetophenon, 2',6'-Dihydroxyacetophenon, 3,4-Dimethoxyacetophenon, 2'-Hydroxyacetophenon, 4'-Hydroxyacetophenon, 3'-Methoxyacetophenon, 4'-Methoxyacetophenon, 2'-Methylacetophenon, 4'-Methylacetophenon, 2'-Nitroacetophenon, 3'-Nitroacetophenon, 4'-Nitroacetophenon, 4'-Phenylacetophenon, 3',4',5'-Trimethoxyacetophenon, 4'-Aminopropiophenon, Benzoylacetone, Benzoylpropionsäure, Benzylidenacetophenon, Cyclohexylphenylketon, Desoxybenzoin, 4',4'-Dimethoxybenzil, 1,3-Diphenyl-1,3-propandion, O-Ethylbenzoin, Ethyl-benzoylacetat, Ethyl-(phenylglyoxylat), 4'-Hydroxypropiophenon, 1,3-Indandion, 1-Indanon, Isopropylphenylketon, 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalin-1-on, Methylphenylglyoxylat, Phenylglyoxylonitril, 1-Phenyl-1,2-propandion-2-oxim, Propiophenon, Valerophenon, 2-Acetyl- $\gamma$ -butyrolacton, 2-Acetylpyrrol, 1-Benzylpiperidin-4-on, Dehydracetsäure, 3,4-Dihydro-4,4-dimethyl-2H-pyran-2-on, 1,4-Dihydro-4-pyridimon, N-Ethoxycarbonyl-4-piperidimon, 2-Furylmethylketon, 5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-on, 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon, 3-Indolylmethylketon, Isatin, 1-Methyl-4-piperidimon, Methyl-2-pyridylketon, Methyl-3-pyridylketon, Methyl-4-pyridylketon, Methyl-2-thienylketon, Phenyl-2-pyridylketon, Phenyl-4-pyridylketon, Tetrahydrofuran-2,4-dion, Tetrahydro-4H-pyran-4-on, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon, Xanthon, Acenaphthenchinon, Brenztraubensäure, (1R)-(-)- Campherchinon, (1S)-(+)- Campherchinon, 3,5-Di-tert-butyl-o-benzochinon, 1,2-Dihydroxycyclobuten-3,4-dion, Ethyl-(2-amino-4-thiazolyl)-glyoxylat, Ethyl-(phenylglyoxylat), Ethylpyruvat, 2,3-Hexandion, 3,4-Hexandion, 3-Methyl-2-oxo-buttersäure, 3-Methyl-2-oxo-valeriansäure, 4-Methyl-2-oxo-valeriansäure, Methyl-phenylglyoxylat, 2-Oxobuttersäure, 2,3-Pentandion, 9,10-Phenanthrenchinon, Acetoacetanilid, 2-Acetyl- $\gamma$ -buttersäurelacton, 2-Acetylcyclopentanon, Allyl-acetoacetat, Benzoylacetone, tert-Butylacetoacetat, 1,3-Cyclopentandion, Diethyl-3-oxoglutarat, Dimethyl-acetylsuccinat, Dimethyl-3-oxoglutarat, 1,3-Diphenyl-1,3-propandion, Ethyl-acetoacetat, Ethyl-benzoylacetat, Ethyl-butyrylacetat, Ethyl-2-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-2-

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- phenylacetoacetat, Methyl-acetoacetat, 2-Methyl-1,3-cyclohexandion, 2-Methyl-1,3-cyclopentandion, Methyl-isobutyrylacetat, Methyl-3-oxopentanoat, Methylpivaloylacetat, 3-Oxoglutarsäure, Tetrahydrofuran-2,4-dion, 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptandion, 3-Benzoylpropionsäure, 1,4-Cyclohexandion, Dimethyl-acetylsuccinat,
- 5 Ethyllävlumat, 2-Aminoanthrachinon, Anthrachinon, p-Benzochinon, 1,4-Dihydroxyanthrachinon, 1,8-Dihydroxyanthrachinon, 2-Ethylanthrachinon, Methyl-p-benzochinon, 1,4-Naphthochinon, Tetramethyl-p-benzochinon, 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion, 2-Benzoylbenzoesäure, 3-Benzoylpropionsäure, 5,6-Dimethoxyphthalaldehydsäure, Glyoxylsäure, Lävölmensäure, Methyl-(trans-4-oxo-2-pentenoat),
- 10 Phthalaldehydsäure, Terephthalaldehydsäure, Dibutylmaleinat, Dibuthylsuccinat, Dibutylphthalat, Dicyclohexylphthalat, Diethyl-acetamidomalonat, Diethyladipat, Diethyl-Benzylmalonat, Diethyl-butyomalonat, Diethyl-ethoxymethylen-malonat, Diethylethylmalonat, Diethylfumarat, Diethylglutarat, Diethyl-isopropylidenmalonat, Diethyl-maleinat, Diethylmalonat, Diethyl-methylmalonat,
- 15 Diethylloxalat, Diethyl-3-oxoglutarat, Diethyl-phenylmalonat, Diethylphthalat, Diethyl-pimelat, Diethyl-sebacat, Diethyl-suberat, Diethyl-succinat, Diisobutylphthalat, Dimethyl-acethylendicarboxylat, Dimethyl-acetylsuccinat, Dimethyladipat, Dimethyl-2-aminoterephthalat, Dimethylfumarat, Dimethylglutaconat, Dimethylglutarat, Dimethylisophthalat, Dimethylmalonat, Dimethyl-methoxymalonat, Dimethyl-
- 20 (methylen succinat), Dimethylloxalat, Dimethyl-3-oxo-glutarat, Dimethylphthalat, Dimethylsuccinat, Dimethylterephthalat, Ethylenglycoldiacetat, Ethylenglycoldimethacrylat, Monoethylfumarat, Monoethylmalonat, Monoethyladipat, Monomethylphthalat, Monomethylpimelat, Monomethylterephthalat, 1,2-Propylenglycoldiacetat, Triethyl-methantricarboxylat, Trimethyl-1,2,3-propantricarboxylat, 3-Acetoxy-2-cyclohexen-1-on,
- 25 Allyl-acetoacetat, Allyl-(cyanacetat), Benzylacetoacetat, tert-Butylacetoacetat, Butylecyanacetat, Chlorogensäure-Hemihydrat, Cumarin-3-Carbonsäure, Diethyl-ethoxycarbonylmethanphosphonat, Dodecylgallat, Dodecyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat, (2-Ethoxyethyl)acetat, Ethyl-(acetamidocyanacetat), Ethylacetoacetat, Ethyl-2-aminobenzoat, Ethyl-(3-aminopyrazol-4-carboxylat), Ethyl-
- 30 benzoxylacetat, Ethyl-butyrylacetat, Ethyl-cyanacetat, Ethyl-(2-cyan-3-ethoxyacrylat), Ethyl-cyanformiat, Ethyl-2-cyanpropionat, Ethyl-(3,3-diethoxypropionat), Ethyl-1,3-dithian-2-carboxylat, Ethyl-(2-ethoxyacetat), Ethyl-2-furancarboxylat, Ethylgallat, Ethyllävlumat, Ethylmandelat, Ethyl-2-methylactat, Ethyl-4-nitrocinnamat, Ethylloxamat, Ethyl-2-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-4-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-5-oxohexanoat,

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- Ethyl-2-phenylacetoacetat, Ethyl-2-phenylacetoacetat, Ethyl-(phenylglyoxylat), Ethyl-4-piperidincarboxylat, Ethyl-2-pyridincarboxylat, Ethyl-3-pyridincarboxylat, Ethyl-4-pyridincarboxylat, Ethylpyruvat, Ethylthioglycolat, Ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, (2-Hydroxyethyl)-methacrylat, (2-Hydroxypropyl)-methacrylat, 3-Indolacetat, (2-Methoxyethyl)-acetat, (1-Methoxy-2-propyl)-acetat, Methylacetoacetat, Methyl-2-aminoabenzooat, Methyl-3-aminocroconat, Methyl-cyanacetat, Methyl-(4-cyanbenzoat), Methyl-(4-formylbenzoat), Methyl-2-furancarboxylat, Methyl-isobutyrylacetat, Methyl-methoxyacetat, Methyl-2-methoxybenzoat, Methyl-3-oxopentanoat, Methyl-phenylglyoxylat, Methyl-phenylsulfinylacetat, Methylpivaloylacetat, Methyl-3-pyridincarboxylat, 5-Nitrofurfurylidendiacetat, Propylgallat, Propyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, Methyl-(3-methylthiopropionat), Acetamid, Acetanilid, Benzanilid, Benzanilid, N,N-Diethylacetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Diethyl-3-methylbenzamid, Diethyltoluamid, N,N-Dimethylacetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Diphenylacetamid, N-Methylformamid, N-Methylformanilid, N-Acetylthioharnstoff, Adipinsäurediamid, 2-Aminobenzamid, 4-Aminobenzamid, Bernsteinsäurediamid, Malonsäurediamid, N,N'-Methylen-diacylamid, Oxalsäurediamid, Pyrazin-2-carbonsäureamid, Pyridin-4-carbonsäureamid, N,N,N',N'-Tetramethylbernsteinsäurediamid, N,N,N',N'-Tetramethylglutarsäurediamid, Acetoacetanilid, Benzohydroxamsäure, Cyanacetamid, 2-Ethoxybenzamid, Diethyl-acetamidomalonat, Ethyl-(acetamidocyanacetat), Ethyloxamat, Hippursäure-Na-Salz, N-(Hydroxymethyl)-acrylamid, L-(-) Michsäureamid, 2'-Nitroacetanilid, 3'-Nitroacetanilid, 4'-Nitroacetanilid, Paracetamol, Piperin, Salicylanilid, 2-Acetyl- $\gamma$ -butyrolacton,  $\gamma$ -Butyrolacton,  $\epsilon$ -Caprolacton, Dihydrocumarin, 4-Hydroxycumarin, 2(5H)-Furanon, 2,5-Dihydro-5-methoxy-2-furanon, Phthalid, Tetrahydrofuran-2,4-dion, 2,2,6-Trimethyl-1,3-dioxin-4-on,  $\gamma$ -Valerolacton, 4-Amino-1,3-dimethyluracil, Barbinursäure, O-Benzylloxycarbonyl-N-hydroxy-succinimid, Bernsteinsäureimid, 3,6-Dimethylpiperazin-2,5-dion, 5,5-Diphenylhydantoin, Ethyl-1,3-dioxoisindolin-2-carboxylat, 9-Fluorenylmethyl-succinimidyl-carbonat, Hydantoin, Maleimimid, 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-on, 1-Methyl-2-pyrrolidon, Methyluracil, 6-Methyluracil, Oxindol, Phenytoin, 1(2H)-Phthalazinon, Phthalimid, 2,5-Piperazindion, 2-Piperidimon, 2-Pyrrolidon, Rhodanin, Saccharin, 1,2,3,6-Tetrahydrophthalimid, 1,2,3,4-Tetrahydro-6,7-dimethoxy-chinazolin-2,4-dion, 1,5,5-Trimethylhydantoin, 1-Vinyl-2-pyrrolidon, Di-tert-butylidicarbonat, Diethylcarbonat, Dimethylcarbonat, Dimethyldicarbonat, Diphenylcarbonat, 4,5-Diphenyl-1,3-dioxol-2-on, 4,6-Diphenylthieno(3,4-d)-1,3-dioxol-2-

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- on-5,5-dioxid, Ethylencarbonat, Magnesium-methoxid-methyl-carbonat,  
 Monomethylcarbonat-Na-Salz, Propylencarbonat, N-Allylharnstoff,  
 Azodicarbonsäurediamid, N-Benzylharnstoff, Biuret, 1,1'-Carbonyldiimidazol, N,N-  
 Dimethylharnstoff, N-Ethylharnstoff, N-Formylharnstoff, Harnstoff, n-Methylharnstoff, N-  
 5 Phenylharnstoff, 4-Phenylsemicarbazid, Tetramethylharnstoff, Semicarbazidhydrochlorid,  
 Diethyl-azodicarboxylat, Methylcarbamat, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-  
 ethanon, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanol.

Weiterhin bevorzugt sind Anhydride wie:

- Benzoessäureanhydrid, Benzol-1,2,4,5-tetracarbonsäure-1,2,4,5-dianhydrid, 3,3',4,4'-  
 10 Benzophenontetracarbonsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Buttersäureanhydrid,  
 Crotonsäureanhydrid, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid, Di-tert-butylidicarbonat,  
 Dimethyldicarbonat, Dodecenybernsteinsäureanhydrid, Epicon B4400, Essigsäureanhydrid,  
 Glutarsäureanhydrid, Hexansäureanhydrid, Isatossäureanhydrid, Isobuttersäureanhydrid,  
 Isovaleriansäureanhydrid, Maleinsäureanhydrid, Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid,  
 15 3-Nitrophthalsäureanhydrid, 5-Norboren-2,3-dicarbonsäureanhydrid, Phthalsäureanhydrid,  
 2-Phenylbuttersäureanhydrid, Pivalinsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid, cis-1,2,3,6-  
 Tetrahydrophthalsäureanhydrid, Valeriansäureanhydrid.

Besonders bevorzugt sind Benzophenone wie:

- Benzophenon, 4-Aminobenzophenon, 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Benzophenon-2-  
 20 carbonsäure, (S)-(-)-2-(N-Benzopropyl)-aminobenzophenon, 4,4'-Bis-(dimethylamino)-  
 benzophenon, 4,4'-Bis-(diethylamino)-benzophenon, 3,4-Dimethoxybenzophenon,  
 4,4'-Dihydroxybenzophenon, 2,4-Dihydroxybenzophenon, 4-Hydroxybenzophenon,  
 2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenon, 4-Methoxybenzophenon, 4,4'-Dimethoxybenzo-  
 phenon, 2,2',4,4' Tetrahydroxybenzophenon, 2-Chlorbenzophenon.

25

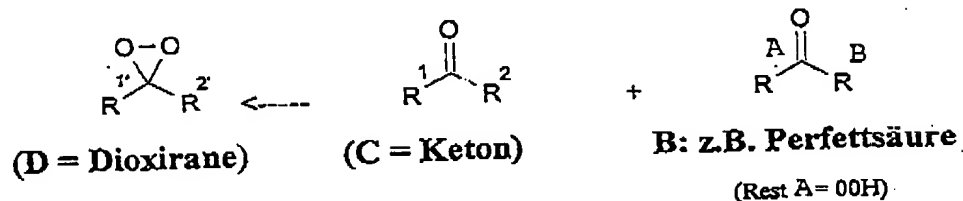
30

WO 98/59108

Abbildung 1 zeigt schematisch einen möglichen Reaktionscyclus aller Komponenten:

Abb.1:

5



10



15



Lipase/Amidase

20

Komponente 1) = Enzym/ Hydrolase: z.B. Lipase/Amidase

Komponente 2) = Fettsäure (A)

25 Komponente 3) = Oxidationsmittel (Oxi)

Komponente 4) = Keton (C)

B) = z.B. Perfettsäure

30 D) = Dioxirane

35

40

45

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Genauere Beschreibung des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) in Bezug auf die verschiedenen Anwendungen:

**D) Einsatz in der Zellstoffbleiche**

- 5 Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird Enzym, bevorzugt Lipase aus z.B. *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05 bis 5 mg pro g Zellstoff, bevorzugt 0.05 mg bis 2 mg Enzym pro g Zellstoff (entsprechend ca. 250 bis 10000 IU pro g Zellstoff) eingesetzt (1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).
- 10 Vorzugsweise wird die Delignifizierung (Bleiche) durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-9, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C, und einer Stoffdichte von 0,5 bis 40 % durchgeführt.
- 15 Ein für den Einsatz von Enzymen bei der Zellstoffbleiche ungewöhnlicher und überraschender Befund ist, daß beim Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems eine Steigerung der Stoffdichte eine erhebliche Steigerung der Kappaerniedrigung ermöglicht.
- Aus ökonomischen Gründen bevorzugt wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bei
- 20 Stoffdichten von 4 bis 35 %, besonders bevorzugt 4 bis 15 % durchgeführt.

Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Zellstoff (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 10 mg pro g Zellstoff zugesetzt.

25

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Zellstoff, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg pro g Zellstoff eingesetzt.

30

Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Zellstoff, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg pro g Zellstoff eingesetzt.



WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Der Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems in einem Verfahren zum Behandeln von Lignin erfolgt beispielsweise dadurch, daß man die jeweils ausgewählten Komponenten gleichzeitig oder in beliebiger Reihenfolge mit einer wässrigen Suspension des ligninhaltigen Materials

5 mischt. Vorzugsweise wird die Reaktion durch Zugabe des Oxidationsmittels oder der Enzyms gestartet.

Neben diesen oben genannten Hauptkomponenten des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wie Enzyme (Lipasen/Amidasen),

10 Oxidationsmittel, Fettsäuren und Ketone, kann das Bleichsystem zusätzlich phenolische Verbindungen und/oder nicht phenolische Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen enthalten, die v.a. dem besseren „Oxidationstransfer“ (Redoxkaskade) und/oder dem Abfangen von Radikalen dienen können, die eventuell zu einer Polymerisation des Lignins führen

15 könnten.

Neben dem oben erfindungsmäßig bevorzugten Oxidationsmittel  $H_2O_2$  sind besonders bevorzugt: Luft, Sauerstoff (eventuell zusätzlich zu  $H_2O_2$ ), organische Peroxide, Perverbindungen wie Natriumperborat und/oder

20 Natriumpercarbonat, Persulfate u.a. (eventuell zusammen mit Aktivatoren wie TAED, Nitrilaminen, Dicyandiamiden u.a.)

Sauerstoff kann auch durch  $H_2O_2$  + Katalase o.ä. Systeme in situ generiert werden oder  $H_2O_2$  aus GOD + Glucose o.ä. Systeme in situ generiert werden.

25 Die Wirksamkeit des erfindungsmäßigen Oxidationssystems als Enzym-Komponenten-System (ECS) beim Verändern, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen ist häufig nochmals gesteigert, wenn neben den genannten Bestandteilen noch  $Mg^{2+}$  Ionen vorhanden sind. Die  $Mg^{2+}$  Ionen können beispielsweise als Salz, wie z.B.  $MgSO_4$ , eingesetzt werden. Die Konzentration liegt im Bereich von 0,1 - 2

30 mg/g ligninhaltigem Material, vorzugsweise bei 0,2 - 0,6 mg/g.

In manchen Fällen läßt sich eine weitere Steigerung der Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) dadurch erreichen, daß das System neben den  $Mg^{2+}$  Ionen auch Komplexbildner wie z.B. Ethylendiamintetraessigsäure

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

(EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), Hydroxyethylendiamintriessigsäure (HEDTA), Diethylentriaminpentamethylenphosphonsäure (DTMPA), Nitrilotriessigsäure (NTA), Polyphosphorsäure (PPA) etc. enthält. Die Konzentration liegt im Bereich von 0,2 - 5 mg/g ligninhaltigem Material, vorzugsweise bei 1 - 3 mg.

5

Überraschenderweise zeigte sich ferner, daß eine saure Wäsche (pH 2 bis 6, vorzugsweise 2 bis 5) oder Q-Stufe (pH-Wert 2 bis 6, vorzugsweise 2 bis 5) vor der ECS-Stufe bei manchen Zellstoffen zu einer erheblichen Kappazahlerniedrigung im Vergleich zur Behandlung ohne diese spezielle Vorbehandlung führt. In der Q-Stufe werden als Chelatbildner die zu diesem Zwecke üblichen Substanzen (wie z.B. EDTA, DTPA) eingesetzt. Sie werden vorzugsweise in Konzentrationen von 0,1 %/to bis 1 %/to besonders bevorzugt 0,1 %/to bis 0,5 %/to eingesetzt.

Gleichzeitig können Reduktionsmittel zugegeben werden, die zusammen mit den vorhandenen Oxidationsmitteln zur Einstellung eines bestimmten Redoxpotentials dienen. Als Reduktionsmittel können Natrium-Bisulfit, Natrium-Dithionit, Ascorbinsäure, Thioverbindungen, Mercaptoverbindungen oder Glutathion etc. eingesetzt werden.

Außerdem können dem System Radikalbildner oder Radikalfänger (Abfangen von beispielsweise OH<sup>•</sup> oder OOH<sup>•</sup> Radikalen) zugesetzt werden. Diese können das Zusammenspiel innerhalb der Red/Ox- und Radikalmediatoren verbessern.

Der Reaktionslösung können auch weitere Metallsalze zugegeben werden. Diese sind im Zusammenwirken mit Chelatbildnern als Radikalbildner oder Red/Ox-Zentren wichtig. Die Salze bilden in der Reaktionslösung Kationen. Solche Ionen sind u.a. Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup>, Mn<sup>4+</sup>, Cu<sup>1+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ti<sup>3+</sup>, Cer<sup>4+</sup>, Al<sup>3+</sup>.

Die in der Lösung vorhandenen Chelate können darüber hinaus als Mimicsubstanzen für bestimmte Oxidoreduktasen wie die Laccasen (Kupferkomplexe) oder für die Lignin- oder Manganperoxidasen (Hämkomplexe) dienen. Unter Mimicsubstanzen sind solche Stoffe zu verstehen, die die prosthetischen Gruppen von (hier) Oxidoreduktasen simulieren und z.B. Oxidationsreaktionen katalysieren können.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Weiterhin kann dem Reaktionsgemisch NaOCl zugesetzt werden. Diese Verbindung kann im Zusammenspiel mit Wasserstoffperoxid Singulett-Sauerstoff bilden.

- Schließlich ist es auch möglich, unter Einsatz von Detergentien zu arbeiten. Als solche kommen nicht-ionische, anionische, kationische und amphotere Tenside in Betracht. Die
- 5 Detergentien können die Penetration der Enzyme und der anderen Komponenten in die Faser verbessern.

Ebenso kann es für die Reaktion förderlich sein, Polysaccharide und/oder Proteine zuzusetzen. Hier sind insbesondere als Polysaccharide Glucose, Mannane, Dextrane,

- 10 Lävane, Pektine, Alginate oder Pflanzengummis und als Proteine Gelatine und Albumin zu nennen.

Diese Stoffe dienen hauptsächlich als Schutzkolloide für die Enzyme.

Weitere Proteine, die zugesetzt werden können, sind Proteasen wie Pepsin, Bromelin,

- 15 Papain usw.. Diese können u.a. dazu dienen, durch den Abbau des im Holz vorhandenen Extensins (hydroxyprolinreiches Protein) einen besseren Zugang zum Lignin zu erreichen.

Als weitere Schutzkolloide kommen Aminosäuren, Einfachzucker, Oligomierzucker, PEG-Typen der verschiedensten Molekulargewichte, Polyethylenoxide, Polyethylenimine und

- 20 Polydimethylsiloxane in Frage.

Weiterhin können dem erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System Stoffe zugesetzt werden, die die Hydrophobizität des Reaktionsmilieus verstärken und somit quellend auf das Lignin in den Fasern wirken und somit dessen Angreifbarkeit erhöhen.

Solche Stoffe sind z.B. Glycole wie: Propylenglycol, Ethylenglycol, Glycolether wie:

- 25 Ethylenglycoldimethylether etc. aber auch Lösungsmittel wie z.B. Alkohole wie: Methanol, Ethanol, Butanol, Amyl-alkohol, Cyclohexanol, Benzylalkohol, Chlorhydrin, Phenole wie: Phenol, Methyl- und Methoxyphenole, Aldehyde wie: Formaldehyd, Chloral, Mercaptane wie: Butylmercaptan, Benzylmercaptan, Thioglycolsäure, Organische Säuren
- 30 wie: Ameisensäure, Essigsäure, Chloressigsäure, Amine wie Ammoniak, Hydrazin, Hydrotope Lösungsmittel wie: z.B. konz. Lösungen von Natriumbenzoat, Sonstige wie: Benzole, Pyridine, Dioxan, Acetessigsäureethylester, andere basische Lösungsmittel wie OH/H<sub>2</sub>O, bzw. OH/Alkohole u.a.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Das erfindungsgemäße Verfahren kann nicht nur bei der Delignifizierung (Bleiche) von Sulfat-, Sulfit-, Organosolv-, o.a. Zellstoffen und von Holzstoffen eingesetzt werden, sondern auch bei der Herstellung von Zellstoffen allgemein, sei es aus Holz- oder Einjahrespflanzen, wenn eine Defibrillierung durch die üblichen Kochverfahren (verbunden  
5 eventuell mit mechanischen Verfahren oder Druck) d.h. eine sehr schonende Kochung bis zu Kappazahlen, die im Bereich von ca. 50 - 120 Kappa liegen können, gewährleistet ist.

Bei der Bleiche von Zellstoffen wie auch bei der Herstellung von Zellstoffen kann die Behandlung mit dem erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS) einmalig  
10 erfolgen oder mehrfach wiederholt werden, entweder vor und/oder nach Wäsche und Extraktion des behandelten Stoffes mit NaOH etc. oder ohne diese Zwischenschritte aber auch vor und/oder nach Vor- und/oder Nachbehandlungsschritten wie Saurer Wäsche, Q-Stufen, alkalisches leaching, Bleichstufen; wie Peroxidbleichen, O<sub>2</sub>-verstärkte Peroxidstufen, Druckperoxidstufen, O<sub>2</sub>-Delignifizierung, Cl<sub>2</sub>-Bleiche, ClO<sub>2</sub>-Bleiche, Cl<sub>2</sub>  
15 /ClO<sub>2</sub>-Bleiche, Persäurebleichstufen, Persäure-verstärkte O<sub>2</sub>-Bleiche/Peroxidbleiche, Ozonbleiche, Dioxiranbleiche, reduktive Bleichstufen, andere Behandlungen wie: Quellstufen, Sulfonierungen, NO/NO<sub>2</sub>-Behandlungen, Nitrosylschwefelsäurebehandlung, Enzymbehandlungen wie z.B. Behandlungen mit Hydrolasen wie Cellulasen und/oder Hemicellulasen (z.B. Xylanase, Mannanase etc.) und/oder Amylasen und/oder Pektinasen  
20 und/oder Proteinasen und/oder Lipasen und/oder Amidasen und/oder Oxidoreduktasen wie z.B. Laccasen und/oder Peroxidasen etc. bzw. mehreren kombinierten Behandlungen erfolgen.

Dies führt zu noch wesentlich weiter reduzierbaren Kappawerten und zu erheblichen Weißesteigerungen. Ebenso kann vor der ECS-Behandlung eine O<sub>2</sub>-Stufe eingesetzt  
25 werden oder auch wie bereits erwähnt eine saure Wäsche oder Q-Stufe (Chelatstufe) ausgeführt werden.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert:

#### 30 Beispiel 1

**Enzymatische Bleiche von Softwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**

5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdicke 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

35 A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Benzophenon und 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.

B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* versetzt (ca. 25000IU).

- 5 Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.  
Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.  
Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.  
Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C,  
10 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.  
Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.  
Ergebnis vergl. Tabelle 1.

#### Beispiel 1 a

- 15 **Enzymatische Bleiche von Softwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**  
5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:  
A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Aceton und 2.5 mg  
20 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.  
B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* versetzt (ca. 25000IU).  
25 Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.  
Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.  
Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.  
Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C,  
30 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.  
Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.  
Ergebnis vergl. Tabelle 1.

#### Beispiel 1 b (+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivator :Nitrilamin)

- 35 **Enzymatische Bleiche von Softwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**  
5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:  
A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Aceton, 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
40 (30%ige Ware) und 0.5 mg Nitrilamin pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.  
B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* versetzt (ca. 25000IU).  
45 Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.  
Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.  
Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.  
Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C,  
50 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.  
Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Ergebnis vergl. Tabelle 1.

5 **Beispiel 2**

**Enzymatische Bleiche von Hardwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**

5 g atro Zellstoff (Hardwood O<sub>2</sub>-delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

- 10 A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Benzophenon und 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.

- 15 B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von Humicola lanuginosa versetzt (ca. 25000IU).

Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.

Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.

- 20 Danach wird der Stoff über einem Nygonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C, 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Ergebnis vergl. Tabelle 1.

- 25 Ergebnis vergl. Tabelle 1.

**Beispiel 2 a**

30

**Enzymatische Bleiche von Hardwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**

5 g atro Zellstoff (Hardwood O<sub>2</sub>-delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

- 35 A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Aceton und 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.

- B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von Humicola lanuginosa versetzt (ca. 25000IU).

- 40 Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.

Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.

- 45 Danach wird der Stoff über einem Nygonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C, 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Ergebnis vergl. Tabelle 1.

30

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**Beispiel 3****Enzymatische Bleiche von Softwood O<sub>2</sub>-delignifiziert (Sulfatzellstoff)**5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub>-delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden

5 zu folgenden Lösungen gegeben:

A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Benzophenon und 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7.5 resultiert.10 B) 5 ml Leitungswasser werden mit 200 IU Amidase von *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma A 6691) versetzt (1 IU = Umsatz von 1 µmol Acetamid und Hydroxylamin zu Acetohydroxamsäure und NH<sub>3</sub> pro Minute bei pH 7.2 und 37 °C).

Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.

15 Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.

Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C, 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.

20 Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.  
Ergebnis vergl. Tabelle 1.**Tabelle 1**

25	Zellstoff	% Delignifizierung (vor Extraktion)	% Delignifizierung (nach Extraktion)
30	a) Softwood (unbehandelt)	---	5.8%
	b) Softwood (behandelt/Lipase)	19%/17.5% *	32.0%/31%*/35%**
35	c) Hardwood (unbehandelt)	---	6.5%
	d) Hardwood (behandelt/Lipase)	21%/18% *	33%/28%*
40	e) Softwood (behandelt/Amidase)	15.5%	23%
45	f) Vergleichsbeispiel: Laccase + HOBT (5kg/to Zellstoff/ sonst. Bedingungen wie in WO 96/ 18770 (Stoff a/b)	17.5%	22%

50 \* unterstrichene Werte mit Aceton als Keton

\*\* Wert + Nitrilamin

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**II) Einsatz bei der enzymatischen Abwasserbehandlung, z.B. von Schleiferei-Abwasser aus der Papierindustrie**

Da in dieser Anwendung kein Ligninabbau erwünscht ist, sondern eine Aufpolymerisierung von im Abwasser enthaltenem Lignin oder Ligninbestandteilen, kann das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System (ECS) mit geringer Dosage von Polymerisationskatalysatoren eingesetzt.

Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird Enzym, bevorzugt Lipase aus *Aspergillus spec.*, in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt 0.05 mg bis 10 mg Enzym pro Liter Abwasser (entsprechend ca. 250 bis 50000 IU pro Liter Abwasser) eingesetzt (1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).

Vorzugsweise wird die Behandlung des Schleiferei-Abwassers durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-6, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C durchgeführt.

Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser zugesetzt.

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

Desweiteren werden zur Steigerung der Effizienz des Verfahrens und um weniger Fällmittel (meist Natriumaluminat/Aluminiumsulfat) einsetzen zu müssen, welche den Hauptkostenfaktor darstellen, Polymerisationskatalysatoren eingesetzt, meistens phenolische Substanzen bzw. Polycyclen mit mehreren oxidierbaren Hydroxylgruppen wie hier bevorzugt z.B. Purpurogallin.



WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Diese Substanzen werden in einer Konzentration von 0.005 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.005 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

Im folgenden wird die Erfindung an Hand von Beispielen näher erläutert:

5

#### Beispiel 4

- 10 Zu 190 ml Schleiferei-Abwasser werden nach Einstellung des Wassers auf pH 6 und Vortemperierung des Wassers in einem entsprechenden doppelwandigen Reaktionsgefäß auf 45 ° C folgende Lösungen gegeben:

1. Enzymlösung Lipase (*Aspergillus spec.*): 1mg in 0,1 ml Wasser.

2) Fettsäurelösung: 1 mg Dodecansäure in 1ml Wasser.

- 15 3) Ketonlösung: 1 mg 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon in 1 ml Wasser.

4) Polymerisationskatalysator: 0.1 mg Purpurgallin in 0.1 ml Wasser.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Lösung 5) (Oxidationsmittel --> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gestartet; es werden 3.3 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) in 0.1 ml Wasser zugegeben und das Volumen mit vorgewärmten Abwasser auf 200 ml aufgefüllt

- 20 Die Reaktion wird für 1bis 4 Stunden fortgeführt, vorzugsweise 2 Stunden.

Danach wird das Abwasser entweder nur filtriert, filtriert und mit 0.2%/0.2% oder 0.5%/0.5% Aluminiumsulfatlösung/ Natriumaluminatlösung, jeweils 10 Gew. %ig gefällt im Vergleich zum unbehandelten Nullwert. Das Lignin, welches normalerweise im Schleifereiwasser ohne Behandlung im Bereich von 600 bis 900 mg Lignin pro Liter  
25 vorhanden ist wird durch photometrische Bestimmung bei 280 nm quantifiziert. Die Abnahme des Lignins ist ein Maß für die CSB-Reduktion und für die Effizienz des Systems. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammen gefaßt.

#### Beispiel 5

- 30 (ohne Polymerisationskatalysator)

Zu 190 ml Schleiferei-Abwasser werden nach Einstellung des Wassers auf pH 6 und Vortemperierung des Wassers in einem entsprechenden doppelwandigen Reaktionsgefäß auf 45 ° C folgende Lösungen gegeben:

- 35 1. Enzymlösung Lipase (*Aspergillus spec.*): 1mg in 0,1 ml Wasser.

2) Fettsäurelösung: 1 mg Dodecansäure in 1ml Wasser.

3) Ketonlösung: 1 mg 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon in 1 ml Wasser.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Lösung 4) (Oxidationsmittel --> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

gestartet; es werden 3.3 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) in 0.1 ml Wasser zugegeben und das

- 40 Volumen mit vorgewärmten Abwasser auf 200 ml aufgefüllt.,

Die Reaktion wird für 1bis 4 Stunden fortgeführt, vorzugsweise 2 Stunden.

Danach wird das Abwasser entweder nur filtriert, filtriert und mit 0.2%/0.2% oder 0.5%/0.5% Aluminiumsulfatlösung/ Natriumaluminatlösung, jeweils 10 Gew. %ig gefällt im Vergleich zum unbehandelten Nullwert. Das Lignin, welches normalerweise im

- 45 Schleifereiwasser ohne Behandlung im Bereich von 600 bis 900 mg Lignin pro Liter vorhanden ist wird durch photometrische Bestimmung bei 280 nm quantifiziert. Die Abnahme des Lignins ist ein Maß für die CSB-Reduktion und für die Effizienz des Systems. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

50

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Tabelle 2

	Behandlung	Restlignin n. 2Std. (0-Wert = 600 mg /Liter)
5	ohne Behandlung (filtriert)	CSB 800 mg/l
	ohne Behandlung (filtriert/gefällt*)	720 mg/l
10	mit Behandlung ( Lipase) (filtriert/gefällt*) (mit Polym. Kat.) **	100 mg/l
15	Vergleichsbehandlung: mit 25000 IU Laccase pro Liter Abwasser (filtriert/gefällt*) (mit Polym. Kat.)**	170 mg/l
20	mit Behandlung (Lipase) (filtriert/gefällt*) (ohne Polym. Kat.)	220 mg/l
	mit Behandlung (filtriert/gefällt*)	160 mg/l
25	mit Polym Kat. ** (Humicola Lipase) (Versuch: Polymerisierung und/oder Modifizierung von Lignin /siehe unten)	
	*gezeigt sind nur die 0.5%/0.5%-Fällungen	
30	** Polymerisationskatalysator	

### III) Einsatz bei der Herstellung von Ligninlösungen oder Gelen, von entsprechenden Bindern/Klebern und von Holzverbundstoffen

Da auch in dieser Anwendung kein Ligninabbau erwünscht ist, sondern eine Aufpolymerisierung und/oder Modifizierung von Lignin oder ligninenthaltenden Materialien, wird das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System (ECS) mit geringem Zusatz von Polymerisationskatalysatoren eingesetzt.

Da es sich herausgestellt hat, daß die Polymerisation von Lignin in z.B. Holzschliffabwasser (Schleifereiabwasser) ein gutes System zur Beurteilung von genereller Polymerisierungseigenschaft auch für den Anwendungszweck als Enzym-Komponenten-System (ECS) bei der Herstellung von Ligninlösungen oder Gelen, von entsprechenden Bindern/Klebern und

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

von Holzverbundstoffen darstellen kann, wurden als Versuche der gleiche Versuchsansatz wie bei den Abwasserversuchen gewählt.

- Dabei ist aus den oben genannten Patentschriften WO 94/ 01488, WO 93/25622 und WO 93/23477 und DE 3037992 C2 bekannt, daß z.B. bei der Herstellung von „particle board“
- 5 der durch Polymerisation und Lösen von Lignin hergestellte Binder durch Spraysen in einer Menge von ca. 40 bis 100 g pro kg Holzfasermaterial auf dieses aufgebracht wird und das entsprechende Pressen des Materials bei einem Druck von ca. 20-40 kg/cm<sup>2</sup> für ca. 2-4 Minuten bei Erhöhung der Temperatur von ca. 35 auf 190 °C innerhalb von ca. 20 Sekunden erfolgt. Dabei können allerdings auch die beim Pressen nötigen Drücke und
- 10 Temperaturen wesentlich geringer sein, und eine nachfolgende Aushärtung des Binder/Holzfasergermischtes durch weitergehende enzymkatalysierte Reaktionen erwünscht sein.

- Zur Beurteilung der Polymerisationseigenschaften des ECS für diesen Anwendungszweck wird - wie oben erwähnt - das oben beschriebene Ligninentfernungssystem aus
- 15 Schleifereiabwasser als Modellsystem verwendet.

- Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird Enzym, bevorzugt Lipase aus *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt 0.05 mg bis 10 mg Enzym pro Liter Abwasser (entsprechend ca. 250 bis 50000 IU pro Liter Abwasser) eingesetzt ( 1 IU hydrolysiert 1
- 20  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).

Vorzugsweise wird die Behandlung des Schleiferei-Abwassers durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-6, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C durchgeführt.

- 25 Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser zugesetzt.

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder

- 30 Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Als weiterer Faktor werden Ketone , bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

Desweiteren werden zur Steigerung der Effizienz des Verfahrens, wie oben bereits erwähnt,

- 5 Polymerisationskatalysatoren eingesetzt, meistens phenolische Substanzen  
bzw. Polycyclen mit mehreren oxidierbaren Hydroxylgruppenm, hier bevorzugt  
z.B. Purpurgallin.

Diese Substanzen werden in einer Konzentration von 0.005 bis 200 mg pro Liter Abwasser, bevorzugt in einer Konzentration von 0.005 bis 50 mg pro Liter Abwasser eingesetzt.

10

#### Beispiel 6

- 15 Zu 190 ml Schleiferei-Abwasser werden nach Einstellung des Wassers auf pH 8.5 und  
Vortemperierung des Wassers in einem entsprechenden doppelwandigen Reaktionsgefäß auf  
45 ° C folgende Lösungen gegeben:

1. Enzymlösung Lipase (*Humicola lanuginosa*): 1mg in 0,1 ml Wasser.
- 2) Fettsäurelösung: 1 mg Dodecansäure in 1ml Wasser.
- 3) Ketonlösung: 1 mg 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon in 1 ml Wasser.
- 20 4) Polymerisationskatalysator: 0.1 mg Purpurgallin in 0.1 ml Wasser.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Lösung 5) (Oxidationsmittel --> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
gestartet; es werden 3.3 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) in 0.1 ml Wasser zugegeben und das  
Volumen mit vorgewärmtem Abwasser auf 200 ml aufgefüllt.

Die Reaktion wird für 1 bis 4 Stunden fortgeführt, vorzugsweise 2 Stunden.

- 25 Danach wird das Abwasser entweder nur filtriert, filtriert und mit 0.2%/0.2% oder  
0.5%/0.5% Aluminiumsulfatlösung/ Natriumaluminatlösung, jeweils 10 Gew.%ig gefällt im  
Vergleich zum unbehandelten Nullwert. Das Lignin, welches normalerweise im  
Schleifereiwasser ohne Behandlung im Bereich von 600 bis 900 mg Lignin pro Liter  
vorhanden ist wird durch photometrische Bestimmung bei 280 nm quantifiziert . Die  
30 Abnahme des Lignins ist ein Maß für die CSB-Reduktion und für die Effizienz des Systems.  
Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

#### IV) Einsatz als enzymatisches Deinksystem

35

Auch bei dieser Anwendung ist kein Ligninabbau erwünscht , sondern eine  
Quellbeeinflussung der ligninhaltigen Fasern zum Loslösen der anhaftenden  
Druckfarbpartikel ähnlich der Wirkung der Natronlauge beim konventionellen chemischen  
Deinken.

- 40 Dem erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS) werden neben den  
üblichen Komponenten wie Lipase, Oxidationsmittel, Fettsäure und Keton eine Reihe von  
phenolischen Substanzen zugesetzt, die bei der Anwendung: Abwasserbehandlung bzw.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Ligninpolymerisation/Modifikation als Polymerisationskatalysatoren dienen. Hier wurde überraschenderweise gefunden, daß diese Substanzen den pH-Wert des Enzymwirkoptimums verschieben und die Performance verbessern können.

Ebenso wurde überraschenderweise gefunden, daß der Zusatz von Reduktionsmitteln, vorzugsweise Dithionit oder Bisulfit die Farbablösungseffizienz steigern kann

Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird Enzym, bevorzugt Lipase aus *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 5 bis 500 mg pro kg luro Altpapier, bevorzugt 5 mg bis 100 mg Enzym pro kg luro Altpapier (entsprechend ca. 25000 bis 500000 IU pro kg Altpapier) eingesetzt ( 1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).

Vorzugsweise wird die Behandlung des Altpapiers zur Entfernung der Druckfarbpartikel durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem Überdruck (maximal 2 bar) und in einem pH-Bereich von 7 bis 11, vorzugsweise pH 7-9, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C durchgeführt.

Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 5 bis 5000 mg pro kg Altpapier (100%ige Ware), vorzugsweise 5 bis 1000 mg pro kg Altpapier zugesetzt.

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 5 bis 2000 mg pro kg Altpapier, bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis 500 mg pro kg Altpapier eingesetzt.

Als weiterer Faktor werden Ketone , bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 5 bis 2000 mg pro kg Altpapier, bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis 500 mg pro kg Altpapier eingesetzt.

Desweiteren werden zur Steigerung der Effizienz des Verfahrens die oben erwähnten Verbindungen eingesetzt, wie phenolische Substanzen bzw. Polycyclen mit mehreren

oxidierbaren Hydroxylgruppen , bevorzugt z.B. Bisphenol A

Diese Substanzen werden in einer Konzentration von 1 bis 2000 mg pro kg Altpapier, bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 500 mg pro kg Altpapier eingesetzt.

Deweiteren werden Reduktionsmittel eingesetzt mit Vorzug Na-Dithionit oder Na-Bisulfit

in einer Konzentration von 0.1 bis 1000 mg pro kg Altpapier, bevorzugt in einer Konzentration von 0.1 bis 200 mg pro kg Altpapier.

Zur Sammlung der Druckfarbpartikel werden handelsübliche Detergentien als Sammler eingesetzt, bevorzugt Incopur-Typen, z.B. Incopur RSGA in einer Konzentration von 1 bis 5000 mg pro kg Altpapier, bevorzugt von 1 bis 1000 mg pro kg Altpapier. Ebenso können zur Verstärkung der Ablösewirkung bei manchen Altpapierzusammensetzungen weitere Enzyme wie Cellulasen und/oder Hemicellulasen (z.B. Xylanase und/oder Mannanasen etc.) und/oder Pektinasen und/oder Oxidoreduktasen zugesetzt werden.

Im folgenden wird die Erfindung durch Beispiele näher beschrieben:

#### 15 Beispiel 7

Ca. 10 kg Wasser (vorgewärmt auf ca. 45 °C) werden in den Pulper einer Lamort-Labordeinking-Anlage gegeben und der pH-Wert mit Natronlauge (und /oder Schwefelsäure) so eingestellt daß nach Zugabe von 1.5 kg lutro Altpapier ( 50% Zeitung, 50 % Illustrierte), die in ca. 2 x 3 cm große Stücke geschnitten wurden und der weiterhin zugegebenen Systembestandteile ein pH-Wert von 8.0 bis 8.5 resultiert.

Diese Systembestandteile (pro kg lutro Altpapier) sind:

- 25 a) 500000 IU Lipase von Humicola lanuginosa pro 100 ml Leitungswasser,
- b) 0.1g Dodecansäure pro 100 ml Leitungswasser,
- c) 0.1g Benzophenon pro 100 ml Leitungswasser,
- d) 0.1g Bisphenol A pro 20 ml 0.1 mol NaOH,
- e) 0.02g Na-Bisulfit pro 10 ml Leitungswasser,
- 30 f) 0.5g Incopur RSGA pro 100 ml Leitungswasser,
- g) 1g (30%ige Ware) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 100 ml Leitungswasser (wird zuletzt zugegeben)

Der Pulper wird nach Zugabe der Systembestandteile a bis g während der Zugabe des Altpapiers gestartet. Danach wird mit ca. 45°C warmen Leitungswasser die Gesamtwassermenge von 15 kg eingestellt. Der Pulpvorgang wird für 10 Minuten fortgeführt.

Danach wird der Faserbrei zur weiteren Reaktion in ein Warmhaltegefäß überführt und bei ca. 40-45 °C für 15 bis 45 Minuten inkubiert.

100 g atro Stoff werden (nach dieser Inkubation) in einer Voith Flotationszelle auf ca. 20 l Gesamt volumen mit Leitungswasser (45 °C) aufgefüllt und für 10 bis 20 Minuten flотиert. Der Gutstoff wird abgelassen und von den daraus gefertigten Sohlen nach Trocknung in einem handelsüblichen Blattbildner die ISO Weiße und Helligkeit bestimmt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse.

45

**Beispiel 8**

Wie Beispiel 7 : anstelle des erfindungsgemäßen Enzymkomponentensystem (ECS) wird nur Wasser eingesetzt.

5 Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse

**Beispiel 9**

10 Ca. 1 kg Wasser (vorgewärmt auf ca. 45 °C) werden in einen Teigknetter gegeben und der pH-Wert mit Natronlauge (und oder Schwefelsäure) so eingestellt daß nach Zugabe von 150 g lutro Altpapier ( 50% Zeitung, 50 % Illustrierte), die in in ca. 2 x 3 cm große Stücke geschnitten wurden und der weiterhin zugegebenen Systembestandteile ein pH-Wert von 8.0 bis 8.5 resultiert.

- 15 Diese Systembestandteile (pro 100g lutro Altpapier) sind:
- a) 5000IU Amidase von *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma A 6691) pro 100 ml Leitungswasser,
  - (1 IU = Umsatz von 1µmol Acetamid und Hydroxylamin zu Acetohydroxamsäure und NH<sub>3</sub> pro min bei pH 7.2 und 37 °C)
  - 20 b) 0.01g Dodecansäure pro 100 ml Leitungswasser,
  - c) 0.01g Benzophenon pro 100 ml Leitungswasser,
  - d) 0.01 g Bisphenol A pro 20 ml 0.1 mol NaOH,
  - e) 0.002 g Na-Bisulfit pro 10 ml Leitungswasser,
  - f) 0.05 g Incopur RSGA pro 100 ml Leitungswasser,
  - 25 g) 0.1g (30%ige Ware) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 100 ml Leitungswasser (wird zuletzt zugegeben)

Der Teigknetter wird nach Zugabe der systemkomponenten a bis g während der Zugabe des Altpapiers gestartet. Danach wird mit ca. 45°C warmen Leitungswasser die Gesamtwassermenge von 1.5 kg eingestellt. Der Pulpvorgang wird für 10 Minuten

30 fortgeführt.

Danach wird der Faserbrei zur weiteren Reaktion in ein Warmhaltegefäß überführt und bei ca. 40-45 °C für 15 bis 45 Minuten inkubiert.

100 g atro Stoff werden (nach dieser Inkubation) in einer Voith Flotationszelle auf ca. 20 l Gesamtvolumen mit Leitungswasser (45 °C) aufgefüllt und für 10 bis 20 Minuten flотиert.

35 Der Gutstoff wird abgelassen und von den daraus gefertigten Sohlen nach Trocknung in einem handelsüblichen Blattbildner die ISO Weiße und Helligkeit bestimmt.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse.

40

45

50

**Beispiel 10 (Chemischer Ansatz)**

- Ca. 10 kg Wasser (vorgewärmt auf ca. 45 °C) werden in den Pulper einer Lamort-Labordeinking-Anlage gegeben und 1.5 kg lutro Altpapier ( 50% Zeitung, 50 %
- 5 Illustrierte),  
die in in ca. 2 x 3 cm große Stücke geschnitten wurden, werden nach Zugabe folgender Chemikalien (bezogen auf lutro Stoff zugegeben):
- 1) 0.8 Gew.% Seife (DR 3 Henkel)
  - 2) 3.5% Wasserglas
  - 10 3) 2% Natronlauge (100%ig)
  - 4) 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100%ig)
- Der Pulper wird schon während der Zugabe des Altpapiers gestartet. Danach wird mit ca. 45°C warmen Leitungswasser die Gesamtwassermenge von 15 kg eingestellt. Der Pulpvorgang wird für 10 Minuten fortgeführt.
- 15 Danach wird der Faserbrei zur weiteren Reaktion in ein Warmhaltegefäß überführt und bei ca. 40-45 °C für 15 bis 45 Minuten inkubiert.
- 100 g atro Stoff werden (nach dieser Inkubation) in einer Voith Flotationszelle auf ca. 20 l Gesamtvolumen mit Leitungswasser (45 °C) aufgefüllt und für 10 bis 20 Minuten flotiert. Der Gutstoff wird abgelassen und von den daraus gefertigten Sohlen nach Trocknung in
- 20 einem handelsüblichen Blattbildner die ISO Weiße und Helligkeit bestimmt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse.

**Tabelle 3**

25	System	% ISO Weiße
	nur Wasser	51
30	Chemisches System	61
	ECS/Lipase	58.5
	ECS/Amidase	57
35	Vergleichssystem: Laccase (800000 IU/kg Altpapier + Bisphenol A+ Na-Bisulfit (0.1 bzw 0.02g/kg 40 Altpapier), weitere Bedingungen, siehe WO 91/ 14820; WO 92/ 20857	55.5

45

50



### V) Einsatz als Oxidationssystem in der organischen Synthese

Aus der Vielzahl der Einsatzmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wie Hydroxylierungsreaktionen, Oxidation von ungesättigten Aliphaten, Baeyer-Villiger Oxidationen, Oxidation von Heterocyclen, Kohlenstoff-Kohlenstoff Dehydrogenierungen, andere Oxidationsreaktionen soll als beispielhaft die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden und von aromatischen Methylgruppen zu Aldehyden auch im nachfolgenden Beispiel beschrieben werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß diese Reaktionen mit der Oxidoreduktase Laccase und einem Mediator wie ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure) möglich ist:

T. Rosenau et al.; Synthetic Communications, 26 (2), 315-320, (1996); A. Potthast et al.; J. Org. Chem., ( 60), S. 4320-4321, (1995).

Das erfindungsmäßige Verfahren hat hauptsächlich gegenüber diesen Verfahren den Vorteil der geringeren Kosten und der besseren Performance v.a. auch bezogen auf die Kosten.

Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird Enzym, bevorzugt Lipase aus z.B. *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05 bis 5 mg pro 10 mmolar Substrat, bevorzugt 0.05 mg bis 3 mg pro 10 mmolar Substrat (entsprechend ca. 250 bis 15000 IU ) eingesetzt ( 1 IU hydrolysiert 1 µÄquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).

Vorzugsweise wird die Oxidationsreaktion durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-9, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C, und einer Substratkonzentration von 5 bis 100 mmolar, bevorzugt bei einer Substratkonzentration von 5 bis 50 mmolar durchgeführt.

Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100ige Ware) in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro 10 mmolar Substrat vorzugsweise 0.05 bis 30 mg pro 10 mmolar Substrat zugesetzt.

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro 10 mmolar Substrat, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 30 mg pro 10 mmolar Substrat eingesetzt.

Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro 10 mmolar Substrat, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 30 mg pro 10 mmolar Substrat eingesetzt.

- 5 Im folgenden wird die Erfindung an Hand von Beispielen näher erläutert:

**Beispiel 11 (Oxidation von Benzylalkoholen zu Aldehyden)**

- 10 In einem 250 ml Reaktionsgefäß werden zu 50 ml 0.1 molarem Acetatpuffer pH 4.5 folgende Komponenten gegeben:  
 1) p-Methoxybenzylalkohol in 30 ml THF (im Gesamtvolumen 20 mmolar)  
 2) 2 mg Lipase aus *Humicola lanuginosa*  
 3) 5 mg Dodecansäure  
 15 4) 25mg Benzophenon  
 Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 12.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) und für 12 bis 24 Std. fortgeführt.  
 Es werden dann 0.5 ml Reaktionslösung entnommen mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und der Gehalt an p-Methoxybenzaldehyd mittels GC oder GCMS bestimmt.  
 20 Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.

25

**Beispiel 12 (Oxidation von aromatischen Methylgruppen zu Aldehyden)**

- In einem 250 ml Reaktionsgefäß werden zu 50 ml 0.1 molarem Acetatpuffer pH 4.5 folgende Komponenten gegeben:  
 30 1) Toluol in 30 ml THF (im Gesamtvolumen 20 mmolar)  
 2) 2 mg Lipase aus *Humicola lanuginosa*  
 3) 5 mg Dodecansäure  
 4) 25mg Benzophenon  
 Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 12.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) und  
 35 für 12 bis 24 Std. fortgeführt.  
 Es werden dann 0.5 ml Reaktionslösung entnommen mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und der Gehalt an Benzaldehyd mittels GC oder GCMS bestimmt.  
 Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.

40

45

Tabelle 4

	Substrat	Oxidiertes Substrat	% Umsatz
5			
	p-Methoxy- benzylalkohol (Lipase)	p-Methoxybenzaldehyd	98
10	p-Methoxy- benzylalkohol (ABTS/Laccase)	p-Methoxybenzaldehyd	90
15	Toluol (Lipase)	Benzaldehyd	98
	Toluol (ABTS/Laccase)	Benzaldehyd	92
20			

25

#### VI) Einsatz bei der Kohleverflüssigung

In den letzten Jahren wurde der Einsatz von Weißfäulepilzen bei der Verflüssigung  
 30 von Braun- und Steinkohle untersucht und die generelle Möglichkeit bestätigt.  
 Die Patentanmeldungen WO 94/ 29510 und WO 96/ 18770 haben ebenfalls die  
 generelle Möglichkeit des Einsatzes von pilzf freien Systemen mittels Oxidoreduktasen  
 und speziellen Mediatoren aufgezeigt.  
 Überraschenderweise konnte auch für das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System  
 35 (ECS) dessen Einsetzbarkeit zum „Verflüssigen“ des ligninähnlichen dreidimensionalen  
 Netzwerks von polycyclischen, aromatischen Ringsystemen von Braun- oder Steinkohle  
 nachgewiesen werden.

Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) wird  
 40 Enzym, bevorzugt Lipase aus z.B. *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05  
 bis 20 mg pro g atro gemahlener Braunkohle, bevorzugt 0.05 mg bis 10 mg Enzym pro g  
 Kohle (entsprechend ca. 250 bis 50000 IU ) eingesetzt ( 1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent  
 Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).

Vorzugsweise wird Behandlung der Kohle durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem  $O_2$ -Überdruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-9, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C, und einer Stoffdichte von 0,5 bis 40 % durchgeführt.

Ein für den Einsatz von Enzymen ungewöhnlicher und überraschender Befund ist, daß beim Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems eine Steigerung der Stoffdichte eine erhebliche Steigerung der Performance ermöglicht. Aus ökonomischen Gründen bevorzugt wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bei Stoffdichten von 4 bis 35 %, besonders bevorzugt 4 bis 15 % durchgeführt.

Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro g Kohle (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 50 mg pro g Kohle zugesetzt.

Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt  $C_6$  bis  $C_{26}$ , besonders bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$ , ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro g Kohle, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro g Kohle eingesetzt.

Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg pro g Kohle, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro g Kohle eingesetzt.

Die Erfindung ist im folgenden Beispiel näher erläutert:

25

### Beispiel 13

#### **Enzymatische Kohleverflüssigung**

5 g atro Braunkohle oder Steinkohle (Partikelgröße ca. 200 bis 500  $\mu$ ) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

A) 20 ml Leitungswasser werden mit 5mg Tetradecansäure, 25 mg Benzophenon und 12.5 mg  $H_2O_2$  (30%ige Ware) pro g Kohle unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit Schwefelsäure und/oder Natronlauge so eingestellt, daß nach Zugabe der Kohle und des Enzyms pH 8 resultiert.

B) 5 ml Leitungswasser werden mit 10 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* versetzt (ca. 50000IU).

Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 45 ml aufgefüllt.

Nach Zugabe der Kohle wird für 2 min gemixt.

Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.

Danach wird die entsprechend Konsistenz-veränderte Kohle aus dem Reaktionsgefäß entnommen.

## VII) Einsatz als Bleichmittel in Waschmitteln

Beim Einsatz des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) als Bleichmittel in Waschmitteln wird als eine Komponente

- 5 Enzym, bevorzugt Lipase aus z.B. *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro 100 ml Waschlösung, bevorzugt 0.05 mg bis 10 mg Enzym pro 100 ml Waschlösung (entsprechend ca. 250 bis 100000 IU pro 100 ml Waschlösung) eingesetzt (1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 °C) Vorzugsweise wird die Bleiche durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System  
10 in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck in einem pH-Bereich von 2 bis 12, vorzugsweise pH 3-10, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 30 - 95°C durchgeführt.

- Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro 100 ml Waschlösung (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 20  
15 mg pro 100 ml Waschlösung eingesetzt.

- Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro 100 ml Waschlösung, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro 100 ml Waschlösung eingesetzt.  
20

- Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg pro 100 ml Waschlösung, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro Waschlösung eingesetzt.  
25

## Weitere Komponenten

- Zusätzlich kann das Bleichsystem phenolische Verbindungen und/oder nicht  
30 phenolische Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen enthalten. Neben den oben erfindungsmäßig genannten Oxidationsmitteln sind besonders bevorzugt: Luft, Sauerstoff, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organische Peroxide, Natriumperborat und/oder Natriumpercarbonat.

Sauerstoff kann auch durch  $H_2O_2$  + Katalase o.ä. Systeme in situ generiert werden oder  $H_2O$ , aus GOD + Glucose o.ä. Systeme "in situ" generiert werden.

- 5 Bevorzugt wird ferner ein kationenbildendes Metallsalze enthaltendes Mehrkomponentenbleichsystem. Als Kationen werden bevorzugt  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{4+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ti^{3+}$ ,  $Cer^{4+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Al^{3+}$  verwendet.

- Ferner kann das Bleichsystem zusätzlich Polysaccharide und/oder Proteine  
10 enthalten. Als Polysaccharide kommen Glucane, Mannane, Dextrane, Lävane, Pektine, Alginate oder Pflanzengummis und /oder eigene von den Pilzen gebildete oder in der Mischkultur mit Hefen produzierte Polysaccharide in Betracht. Als Proteine sind Gelantine, Albumin u.a. einsetzbar.  
Hinzukommen können Einfachzucker, Oligomerzucker, Aminosäuren, PEG,  
15 Polyethylenoxide, Polyethylenimine und Polydimethylsiloxane.

#### Verwendung des Mehrkomponentensystems

- Verwendung finden kann das erfindungsgemäße Mehrkomponenten-  
20 bleichsystem in Kombination mit an sich bekannten waschaktiven Waschmittelbestandteilen bzw. Waschmitteladditiven.  
Die Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

#### 25 Beispiel 14

- Einfluß des ECS auf teebeschmutzte Standardwollappen  
In 100 ml Waschlösung (in 300 ml Erlenmeyerkolben) wird je ein Stofflappen  
(5x5 cm) bei 40 ° C für 40 min unter Reziprok-Schütteln (120 rpm) inkubiert.  
30 Vor Inkubationsbeginn wird die Waschlösung einer zehnminütigen Temperaturanpassung unterzogen.  
Die Waschlösung wird mit STW (Standard Tap Water) bei 14 ° dH angesetzt.  
Als Enzymdosage werden 2.5 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* / 100 ml  
2.5 mg Tetradecansäure / 100 ml, 12,5 mg Benzophenon / 100 ml und 6.5 mg  $H_2O_2$   
35 (30%ige Ware) eingesetzt.  
Nach Abgießen der „Waschlauge“ wird mit kaltem, starken Wasserstrahl 3x aufgefüllt und abgegossen.  
Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

40

**Beispiel 15**

Einfluß des ECS (Amidase) auf teebeschmutzte Standardwollappen

In 100 ml Waschlösung (im 300 ml Erlenmeyerkolben) wird je ein Stofflappen

(5x5 cm) bei 40 ° C für 40 min unter Reziprok-Schütteln (120 rpm) inkubiert.

Vor Inkubationsbeginn wird die Waschlösung einer zehnmütigen Temperaturanpassung unterzogen.

Die Waschlösung wird mit STW (Standard Tap Water) bei 14 ° dH angesetzt.

Als Enzymdosage werden 1000 IU Amidase / 100 ml,

(1 IU = Umsatz von 1 µmol Acetamid und Hydroxylamin zu Acetohydroxamsäure pro min bei pH 7.2 und 37 °C)

2.5 mg Tetradecansäure / 100 ml, 12,5 mg Benzophenon / 100 ml und 6.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware) eingesetzt.

Nach Abgießen der „Waschlauge“ wird mit kaltem, starken Wasserstrahl 3x

aufgefüllt und abgegossen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

	pH	Weißegrad	Helligkeitsgrad
STW Nullwert	4.5	2.55	2.3
Vollwaschmittel	10.1	8.9	6.15
STW + ECS (Lipase)	8.5	7.5	7.2
STW + ECS (Amidase)	8	6.9	6.3
Flüssigwaschmittel + ECS (Lipase)	8.5	8.5	8.0

Vergleichsversuch:

Flüssigwaschmittel + Laccase+  
HOBT (Bedingungen wie unter  
PCT/EP 96/ 02658; PCT/EP/94/  
/01967

5 6.5 6.0

## VII) Einsatz in der Bleiche/Entfärbung von Textilgeweben

- Als eine Komponente des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) beim Einsatz in der Bleiche/Entfärbung von Textilgeweben wird Enzym, bevorzugt Lipase aus
- 5 z.B. *Humicola lanuginosa*, in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg pro g Denim, bevorzugt 0.05 mg bis 5 mg Enzym pro g Denim (entsprechend ca. 250 bis 25000 IU pro g Denim) eingesetzt (1 IU hydrolysiert 1  $\mu$ Äquivalent Fettsäure von einem Triglycerid in 1h bei pH 7.7 und 37 ° C).
- 10 Vorzugsweise wird die Bleiche/Entfärbung durch das erfindungsmäßige Enzym-Komponenten-System in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck und in einem pH-Bereich von 2 bis 11, vorzugsweise pH 3-9, bei einer Temperatur von 20 bis 95°C, vorzugsweise 40 - 95°C, und einer Stoffdichte von 0,5 bis 40 % durchgeführt. Ein für den Einsatz von Enzymen ungewöhnlicher und überraschender Befund ist, daß beim
- 15 Einsatz des erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-Systems eine Steigerung der Stoffdichte eine erhebliche Steigerung der Performance ermöglicht. Aus ökonomischen Gründen bevorzugt wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bei Stoffdichten von 4 bis 35 %, besonders bevorzugt 4 bis 15 % durchgeführt.
- 20 Als weiterer Faktor wird als Oxidationsmittel vorzugsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Denim (100%ige Ware), vorzugsweise 0.05 bis 10 mg pro g Denim zugesetzt. Als weiterer Faktor werden Fettsäuren in Ein- oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>, besonders bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, ganz besonders bevorzugt Tetradecansäure oder
- 25 Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Denim, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg pro g Denim eingesetzt. Als weiterer Faktor werden Ketone, bevorzugt z.B. Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg pro g Denim, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg pro g Denim eingesetzt.
- 30 Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert:

### Beispiel 16

- 35 **Bleiche mit ECS + Lipase**  
In einen 200 ml Erlenmeyerkolben wird 1g Denim-gewebe gegeben (Stoffdichte 2%).



Der pH- Wert der Lösung (Leitungswasser), die nach Zugabe aller Komponenten 50 ml umfaßt, wird auf pH 6 mit 0.5 n  $H_2SO_4$  voreingestellt.

Es werden 1 mg Lipase aus *Humicola lanuginosa*, 0.5 mg Tetradecansäure, 1 mg Benzophenon und 2.5 mg  $H_2O_2$  (30%ige Ware) pro g Denim zugegeben.

- 5 Der Versuch wird im Schüttelwasserbad (200rpm), bei 45 °C und einer Reaktionsdauer von 45 min ausgeführt. Anschließend wird mit Leitungswasser gewaschen und das Gewebestück an der Luft getrocknet. Dann wird die Helligkeit mit einem Elrephogerät bestimmt. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 6 zu entnehmen

#### 10 Beispiel 17

Bleiche mit ECS + Amidase

In einen 200 ml Erlenmeyerkolben wird 1g Denim-gewebe gegeben (Stoffdicke 2%).

- 15 Der pH- Wert der Lösung (Leitungswasser), die nach Zugabe aller Komponenten 50 ml umfaßt, wird auf pH 6 mit 0.5 n  $H_2SO_4$  voreingestellt.

Es werden 200 IU Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma A 6691), 0.5mg Tetradecansäure, 1mg Benzophenon und 2.5 mg  $H_2O_2$  (30 %ige Ware) pro g Denim zugegeben.

- 20 Der Versuch wird im Schüttelwasserbad (200rpm), bei 45 °C und einer Reaktionsdauer von 45 min ausgeführt. Anschließend wird mit Leitungswasser gewaschen und das Gewebestück an der Luft getrocknet. Dann wird die Helligkeit mit einem Elrephogerät bestimmt. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 6 zu entnehmen

25

30

35

40

Tabelle 6

	System	pH	ISO Weiße
5	unbehandelte Probe	—	4.5
10	Laccase + Violursäure (Vergleichssystem)	3.5	13.5
	ECS System + Lipase	6.0	16.9
15	ECS System + Amidase	6.0	14.5
20	Hypochlorid	4.5	— (nd.)

25 **Zusatz von weiteren Faktoren zum erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS)**

Für alle genannten Applikationen können dem Enzym-Komponenten-System (ECS) die aus den Anmeldungen DE 198 21 263.1 und DE 198 20 947.9 bzw. PCT/DE 98/01313

30 bekannten Komponenten der enzymatischen Oxidationssysteme mit enzymwirkungsverstärkenden Verbindungen zugesetzt werden, enthaltend:

a) mindestens einen Oxidationskatalysator, insbesondere bevorzugt Enzyme wie Oxidoreduktasen der Klassen 1.1.1. bis 1.97 gemäß Internationaler

35 Enzym-Nomenklatur: Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Enzyme Nomenclature, Academic Press, Inc., 1992, S. 24-154), besonders bevorzugt:

- Cellobiose: oxigen- 1-oxidoreductase (Cellobiose oxidase) 1.1.3.25, Cellobiose: quimone -1-oxidoreductase 1.1.5.1, Bilirubinoxidase 1.3.3.5, Cytochromoxidase 1.9.3, Oxigenasen, Lipoxigenasen 1.13, 1.14, Superoxid-dismutase 1.15.11, Ferrioxidase, z.B. Ceruloplasmin 1.16.3.1, und insbesondere bevorzugt Enzyme der Klasse
- 5 1.10, die auf Biphenole und verwandte Verbindungen wirken. Sie katalysieren die Oxidation von Biphenolen und Ascorbaten. Als Akzeptoren fungieren  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  (1.10.1), Cytochrome (1.10.2), Sauerstoff (1.10.3) oder andere (1.10.99). Von diesen wiederum sind Enzyme der Klasse 1.10.3 mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) als Akzeptor besonders bevorzugt.
- 10 Von den Enzymen dieser Klasse sind insbesondere die Enzyme Catechol Oxidase (Tyrosinase) (1.10.3.1), L-Ascorbate Oxidase (1.10.3.3), O-Aminophenol Oxidase (1.10.3.4) und Laccase (Benzoldiol:Oxygen Oxidoreduktase) (1.10.3.2) bevorzugt, wobei die Laccasen (Benzoldiol:Oxygen Oxidoreduktase) (1.10.3.2.) insbesondere bevorzugt
- 15 sind.

- Weiterhin besonders bevorzugt sind die Enzyme der Gruppe 1.11. die auf ein Peroxid als Akzeptor wirken. Diese einzige Subklasse (1.11.1) enthält die Peroxidasen. Ganz besonders bevorzugt sind hier die Cytochrom-C
- 20 Peroxidasen (1.11.1.5), Catalase (1.11.1.6), die Peroxidase (1.11.1.7) die Iodid-Peroxidase (1.11.1.8), die Glutathione-Peroxidase (1.11.1.9), die Chlorid Peroxidase (1.11.1.10), die L-Ascorbat-Peroxidase (1.11.1.11), die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathione-Peroxidase (1.11.1.12), die Mangan Peroxidase (1.11.1.13), die Diarylpropan-Peroxidase (Ligninase, Lignin Peroxidase)
- 25 (1.11.1.14).

- b) mindestens ein geeignetes Oxidationsmittel,
- c) mindestens einen Mediator ausgewählt aus der Gruppe der Hydroxylamine, Hydroxylaminderivate, Hydroxamsäuren,
- 30 Hydroxamsäurederivate, der aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen Verbindungen, die mindestens eine N-Hydroxy-, Oxim-, N-Oxi-, oder N,N'-Dioxi-Funktion enthalten und/oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der Amide wie z.B. Hydrazide oder 1,2,4- Triazolidin- 3,5-dione (Urazole)
- 35 und /oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der Imide wie

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**z.B. Hydantoine****und/oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der Oxokohlenstoffe.**

- Desweiteren kann mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe
- 5 der Carbonylverbindungen, aliphatischen Ether, Phenolether oder Olefine(Alkene), und/oder mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe der oben genannten Mediatoren des NO-, NOH-HRN-OH-Typs und/oder der Amide wie Hydrazide oder Urazole und/oder der Imide wie Hydantoine und/oder der Oxokohlenstoffe eingesetzt werden.
- 10 Ebenso kann mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe der kationradikalbildende Substanzen des Phenothiazintyps und/oder des Phenoxazintyps und/ oder des (R=N-N=R)-Typs\* ( z.B.ABTS), und/oder von arylsubstituierten Alkoholen (Nichtphenole) wie z.B. Veratrylalkohol, und/oder Phenolabkömmlinge wie p-Hydroxycinnamic acid, 2,4- Dichlorphenol, p-
- 15 Hydroxybenzol-Sulfonat, Vanillin (4-Hydroxy-3-Methoxy-benzaldehyd), p-Hydroxybenzoesäure, 5-Amino-2-Hydroxy-benzoesäure (5-Aminosalicylsäure) und/oder Radikalkationverbindungen nach „Wurster“ (Lit.: Angewandte Chemie, 91, 1979, S. 982-997; Chem. Unserer Zeit, 12, 1978, S. 89-98; Römpf Chemie Lexikon, 9. Auflage, 1995) und/ oder Radikalanionen, z.B. Semichimone, die bei der
- 20 enzymatischen Oxidation von Hydrochimonen entstehen können, eingesetzt werden.
- \* (N bedeutet Stickstoff, R bedeutet Reste)
- Dabei ist es wesentlich für die Steigerung der Performance der Enzym/Mediatorsysteme durch die entsprechenden Comediatoren, daß das Mediator/ Comediator-Verhältnis 5000:1 bis 5:1 besonders bevorzugt 500:1 bis 5:1 beträgt, während das Verhältnis beim
- 25 gleichzeitigen Einsatz von mehreren Mediatoren und Comediatoren innerhalb dieser Mediator- bzw. Comediator-konzentrationen von den jeweiligen Kombinationen abhängt.

- Diese erfindungsgemäßen enzymatischen Oxidationssysteme enthalten mindestens ein Oxidationsmittel. Als Oxidationsmittel können beispielsweise Luft, Sauerstoff, Ozon,
- 30 Peroxid-verbindungen wie  $H_2O_2$ , organische Peroxide, Persäuren wie die Peressigsäure, Perameisensäure, Perschwefelsäure, Persalpersäure, Metachlorperoxibenzoessäure, Perchlorsäure, Perverbindungen wie Perborate, Percarbonate, Persulfate oder Sauerstoffspezies und deren Radikale wie OH-Radikal, OOH-Radikal,  $OH^+$ -Radikal, Superoxid

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Dioxygenyl- Kation (O<sub>2</sub><sup>+</sup>), Singulett-sauerstoff, Ozonid (O<sub>3</sub><sup>-</sup>), Dioxirane, Dioxitane oder Fremy Radikale eingesetzt werden.

Die entsprechenden bevorzugten Mediator/Mediationsverstärker- Substanzen nach den Formeln I bis XXII und entsprechende weitere Mediationsverstärker-

5 verbindungen sind in Appendix IV und in Appendix IVa dargestellt.

Im folgenden ist an Hand eines Beispiels für die enzymatische Zellstoffbleiche die für manche Zellstoffsorten mögliche Performanceverbesserung durch die Kombination des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS) und der oben beschriebenen enzymatischen Oxidationssysteme mit enzymwirkungsverstärkenden Verbindungen

10 dargestellt:

### Beispiel 18

(Enzyme: Lipase/Laccase)

15

#### **Enzymatische Bleiche von Softwood (Sulfatzellstoff)**

5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

20 A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Benzophenon und 2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Ware), 37µ Mol Violursäure + 0.37 µMol 4-tert.-Butylurazol pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit 0,5 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lsg. so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 5 resultiert.

25 B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von Humicola lanuginosa (ca. 25000IU) und mit der Menge Laccase von Trametes versicolor versetzt, daß eine Aktivität von 15 U (1 U = Umsatz von 1 µmol ABTS/min/ml Enzym) pro g Zellstoff resultiert.

Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt.

Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

30 Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30 µm) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C, 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt.

35

### Beispiel 19

(Enzyme: Lipase/Peroxidase)

#### 40 **Enzymatische Bleiche von Softwood (Sulfatzellstoff)**

5 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdichte 30% (ca. 17 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

A) 20 ml Leitungswasser werden mit 1mg Tetradecansäure, 5 mg Benzophenon und 2.5

45

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

mg  $H_2O_2$  (30%ige Ware), 37  $\mu$  Mol Violursäure + 0.37  $\mu$  Mol 4-tert.-Butylurazol pro g Zellstoff unter Rühren versetzt, der pH-Wert mit 0,5 mol/l  $H_2SO_4$ -Lsg. so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffs und des Enzyms pH 7 resultiert.

- 5 B) 5 ml Leitungswasser werden mit 5 mg Lipase von *Humicola lanuginosa* (ca. 25000IU) und 0.1 mg Peroxidase (Horseradish) pro g Zellstoff versetzt. Die Lösungen A und B werden zusammen gegeben und auf 33 ml aufgefüllt. Nach Zugabe des Zellstoffes wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt. Danach wird der Stoff in ein auf 45°C vorgeheiztes Reaktionsgefäß gegeben und unter Normaldruck für 1 - 4 Stunden inkubiert.
- 10 Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30  $\mu$ m) gewaschen und 1 Stunde bei 60°C, 2% Stoffdichte und 8% NaOH pro g Zellstoff extrahiert. Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt:

15 **Tabelle 7**

System	(%) DELIG.	(%) DELIG.
	(Lipase/Lacc.)	(Lipase/Peroxid.)
20 ECS + Lipasesystem (+Laccase +Violur- säure -*)	44	---
ECS + Lipasesystem	----	38
25 (+ Peroxidase +Violur- säure -*)		
Laccase (+ Violursäure + *)	27	----
30 Peroxidase (+ Violursäure + *)	----	28

\* Mediationsverstärker= 4-tert.-Butylurazol

35

WO 98/59108

71

PCT/DE98/01689

**Appendix I:****Systemkomponente 2 des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-Systems (ECS)**

- 5 Fettsäuren, die im erfindungsgemäßen Verfahren als Persäurequelle eingesetzt werden, sind z.B.:

**1) gesättigte Fettsäuren**

- |    |                 |                   |
|----|-----------------|-------------------|
| 10 | Butansäure      | (Buttersäure)     |
|    | Pentansäure     | (Valeriansäure)   |
|    | Hexansäure      | (Capronsäure)     |
|    | Heptansäure     | (Önanthsäure)     |
|    | Octansäure      | (Caprylsäure)     |
| 15 | Nonansäure      | (Pelargonsäure)   |
|    | Decansäure      | (Caprinsäure)     |
|    | Undecansäure    |                   |
|    | Dodecansäure    | (Laurinsäure)     |
|    | Tridecansäure   |                   |
| 20 | Tetradecansäure | (Myristinsäure)   |
|    | Pentadecansäure |                   |
|    | Hexadecansäure  | (Palmitinsäure)   |
|    | Heptadecansäure |                   |
|    | Octadecansäure  | (Stearinsäure)    |
| 25 | Nonadecansäure  |                   |
|    | Eicosansäure    | (Arachinsäure)    |
|    | Heneicosansäure |                   |
|    | Docosansäure    | (Behensäure)      |
|    | Tricosansäure   |                   |
| 30 | Tetracosansäure | (Lignocerinsäure) |
|    | Pentacosansäure |                   |
|    | Hexacosansäure  | (Cerotinsäure)    |
|    | Octacosansäure  |                   |
|    | Triacotansäure  | (Melissinsäure)   |

35

**2) ungesättigten Fettsäuren**

- |    |                               |                               |
|----|-------------------------------|-------------------------------|
|    | 10-Udecensäure                |                               |
|    | 9c-Dodecensäure               | (Lauroleinsäure)              |
| 40 | 9c-Tetradecensäure            | (Myristoleinsäure)            |
|    | 9c-Hexadecensäure             | (Palmitoleinsäure)            |
|    | 6c-Octadecensäure             | (Petroselinensäure)           |
|    | 6t-Octodecensäure             | (Petroselaidinsäure)          |
|    | 9c-Octodecensäure             | (Ölsäure)                     |
| 45 | 9t-Octodecensäure             | (Elaidinsäure)                |
|    | 9c,12c-Octadecadiensäure      | (Linolsäure)                  |
|    | 9t,12t-Octadecadiensäure      | (Linolaidinsäure)             |
|    | 9c,12c,13c-Octadecatriensäure | (Linolensäure)                |
|    | 9t,11t,13t-Octadecatriensäure | ( $\alpha$ -Eläostearinsäure) |
| 50 | 9c,11t,13t-Octadecatriensäure | ( $\beta$ -Eläostearinsäure)  |

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

	9c-Eicosensäure	(Gadoleinsäure)
	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	(Arachidonsäure)
	13c-Docosensäure	(Erucasäure)
	13t-Docosensäure	(Brassidinsäure)
5	4,8,12,15,19-Docosapentaensäure	(Clupanodonsäure)

### 3) mehrfach ungesättigte Fettsäuren

10	9,12-Octadecadiensäure	(Linolsäure)
	9,12,15-Octadecatriensäure	(Linolensäure)
	5,9,12-Octadecatriensäure	
	9,11,13-Octadecatriensäure	(Eläostearinsäure)
	9,11,13,15-Octadecatetraensäure	(Parinarsäure)
15	5,11,14-Eicostriensäure	
	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	(Arachidonsäure)
	4,8,12,15,18-Eicosapentaensäure	
	4,8,12,15,19-Decosapentaensäure	(Clupanodonsäure)
	4,8,12,15,18,21-Tetracosahexaensäure	(Nisinsäure)
20	Besonders bevorzugt sind die Tetradecansäure (Myristinsäure) und die Dodecansäure (Laurinsäure).	

25

30

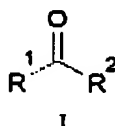
35

40



Appendix II:Systemkomponente 4 (Ketone) des erfindungsmäßigen Enzym-Komponenten-System (ECS)

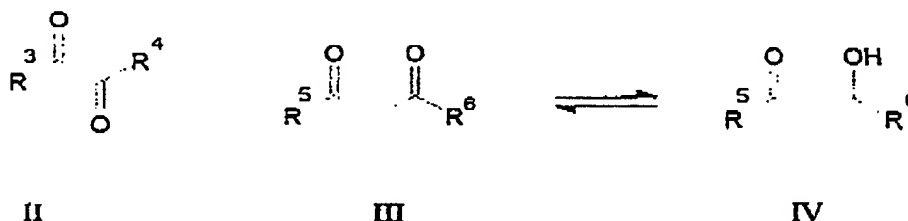
- 5 Besonders bevorzugt sind Carbonylverbindungen der allgemeinen Formel I.



- 10 Die Reste  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  können gleich oder ungleich sein und aliphatische oder aromatische Gruppen darstellen. Weiterhin können die Reste  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  einen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel enthalten kann.

Besonders bevorzugt sind 1,2- Diketone (Formel II) und 1,3-Diketone (Formel III) bzw.

- 15 Polyketone (Polyketide) sowie die tautomeren Enole (Formel IV),



- 20 wobei die Reste  $\text{R}^3$  bis  $\text{R}^6$  jeweils wieder gleich oder ungleich sein können und aliphatische oder aromatische Gruppen darstellen können. Weiterhin können die Reste  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  und die Reste  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^6$  einen gemeinsamen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel enthalten kann.

Dabei ist die Möglichkeit der Tautomerisierung bzw. der Ausbildung eines Resonanz-

- 25 hybrides von besonderer Bedeutung.

Neben allgemeinen Carbonylverbindungen sind besonders bevorzugt Ketone wie allgemein Hydroxyketone,  $\alpha, \beta$  - ungesättigte Ketone, Oxicarbonsäuren, Chinone und Halogenketone.

Daraus weiterhin besonders bevorzugt sind:

- 30 Aceton, Methylethylketon, Diethylketon, Methyl-n-butylketon, Methyl-isobutylketon, Cyclohexanon, Cyclopentanon, 2-Methylcyclohexanon, 3-Methylcyclohexanon,

- 4-Methylcyclohexanon, Dihydroxyaceton, Diacetyl (Monohydrazon), Diacetyl (Dihydrazon), Acetophenon, p-Hydroxyacetophenon, 1-Phenylbutan-3-on, Pentan-3-on, Heptan-4-on, Nonan-2-on, Cycloheptanon, Cyclooctanon, Cyclodecanon, Cyclododecanon, Cyclohexanon, 2-Methylcyclohexanon, 3-Methylcyclohexanon, 4-Methylcyclohexanon,
- 5 Cyclopentanon, 2-Methylcyclopentanon, 3-Methylcyclopentanon, Dimethylketon, Ethylpropylketon, Methylamylketon, Acethylaceton, Pinakolin, Methyl-isopropylketon, Methyl-isoamylketon, Ethylamylketon, Diisopropylketon, Diisobutylketon, Methyl-vinylketon, Methyl-isopropenylketon, Mesityloxid, Isophoron, Hydroxyaceton, Methoxyaceton, 2,3-Pentandion, 2,3-Hexandion, Phenylaceton, Propiophenon,
- 10 Benzophenon, Benzoin, Benzil, 4,4'-Dimethoxybenzil, 4'-Methoxyacetophenon, 3'-Methoxyacetophenon, O-Ethylbenzoin, (2-Methoxyphenyl)-aceton, (4-Methoxyphenyl)-aceton, Methoxy-2-propanon, Glyoxylsäure, Benzylglyoxylat, Benzylaceton, Benzylmethylketon, Cyclohexylmethylketon, 2-Decanon, Dicyclohexylketon, Diethylketon, Diisopropylketon, 3,3-Dimethyl-2-butanon, Isobutylmethylketon, Isopropylmethylketon,
- 15 2-Methyl-3-heptanon, 5-Methyl-3-heptanon, 6-Methyl-5-hepten-2-on, 5-Methyl-2-hexanon, 2-Nonaon, 3-Nonaon, 5-Nonaon, 2-Octanon, 3-Octanon, 2-Undecanon, 1,3-Dichloraceton, 1-Hydroxy-2-butanon, 3-Hydroxy-2-butanon, 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon, 2-Adamantanon, Anthron, Bicyclo(3.2.0)hept-2-en-6-on, *cis*-Bicyclo(3.3.0)octan-3,7-dion, (1S)-(-)-Campher, p-Chloranil, Cyclobutanon, Cyclododecanon, 1,3-Cyclohexandion,
- 20 1,4-Cyclohexandionmonoethylenketal, Dibenzosuberone, Ethyl-4-oxocyclohexancarboxylat, Fluoren-9-on, 1,3-Indandion, Methylcyclohexanon, Phenylcyclohexanon, 4-Propylcyclohexanon, 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthalinon, 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthalinon, 3,3,5-Trimethylcyclohexanon, 3-Acetoxy-2-cyclohexen-1-on, Benzylidenaceton, (R)-(-)-Carvon, (S)-(-)-Carvon, Curcumin, 2-Cyclohexen-1-on, 2,3-
- 25 Diphenyl-2-cyclopropen-1-on, 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on, Isophoron,  $\alpha$ -Jonon,  $\beta$ -Jonon, 3-Methoxy-2-cyclohexen-1-on, 3-Methyl-2-cyclopenten-1-on, 3-Methyl-3-penten-2-on, Methylvinylketon, (R)-(+)-Pulegon, Tetraphenyl-2,4-cyclopentadien-1-on, 2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dion, 2-Acetylbenzoesäure, 1-Acetylnaphthalin, 2-Acetylnaphthalin, 3'-Aminoacetophenon, 4'-Aminoacetophenon, 4'-cyclohexylaceto-
- 30 phenon, 3',4'-Diacetoxyacetophenon, Diacetylbenzol, 2',4'-Dihydroxyacetophenon, 2',5'-Dihydroxyacetophenon, 2',6'-Dihydroxyacetophenon, 3,4-Dimethoxyacetophenon, 2'-Hydroxyacetophenon, 4'-Hydroxyacetophenon, 3'-Methoxyacetophenon, 4'-Methoxyacetophenon, 2'-Methylacetophenon, 4'-Methylacetophenon, 2'-

- Nitroacetophenon, 3'-Nitroacetophenon, 4'-Nitroacetophenon, 4'-Phenylacetophenon, 3',4',5'-Trimethoxyacetophenon, 4'-Aminopropiophenon, Benzoylacetone, Benzoylpropionsäure, Benzylidenacetophenon, Cyclohexylphenylketon, Desoxybenzoin, 4',4'-Dimethoxybenzil, 1,3-Diphenyl-1,3-propandion, O-Ethylbenzoin, Ethyl-benzoylacetat, 5 Ethyl-(phenylglyoxylat), 4'-Hydroxypropiophenon, 1,3-Indandion, 1-Indanon, Isopropylphenylketon, 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalin-1-on, Methyl-phenylglyoxylat, Phenylglyoxylonitril, 1-Phenyl-1,2-propandion-2-oxim, Propiophenon, Valerophenon, 2-Acetyl-γ-butyrolacton, 2-Acetylpyrrol, 1-Benzylpiperidin-4-on, Dehydracetsäure, 3,4-Dihydro-4,4-dimethyl-2H-pyran-2-on, 1,4-Dihydro-4-pyridinon, N-10 Ethoxycarbonyl-4-piperidinon, 2-Furylmethylketon, 5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-on, 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon, 3-Indolymethylketon, Isatin, 1-Methyl-4-piperidinon, Methyl-2-pyridylketon, Methyl-3-pyridylketon, Methyl-4-pyridylketon, Methyl-2-thienylketon, Phenyl-2-pyridylketon, Phenyl-4-pyridylketon, Tetrahydrofuran-2,4-dion, Tetrahydro-4H-pyran-4-on, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon, Xanthon, 15 Acenaphthenchinon, Brenztraubensäure, (1R)-(-)- Campherchinon, (1S)-(+)- Campherchinon, 3,5-Di-tert-butyl-o-benzochinon, 1,2-Dihydroxycyclobuten-3,4-dion, Ethyl-(2-amino-4-thiazolyl)-glyoxylat, Ethyl-(phenylglyoxylat), Ethylpyruvat, 2,3-Hexandion, 3,4-Hexandion, 3-Methyl-2-oxo-buttersäure, 3-Methyl-2-oxo-valeriansäure, 4-Methyl-2-oxo-valeriansäure, Methyl-phenylglyoxylat, 20 2-Oxobuttersäure, 2,3-Pentandion, 9,10-Phenanthrenchinon, Acetoacetanilid, 2-Acetyl-γ-buttersäurelacton, 2-Acetylcyclopentanon, Allyl-acetoacetat, Benzoylacetone, tert-Butylacetoacetat, 1,3-Cyclopentandion, Diethyl-3-oxoglutarat, Dimethyl-acetylsuccinat, Dimethyl-3-oxoglutarat, 1,3-Diphenyl-1,3-propandion, Ethyl-acetoacetat, Ethyl-benzoylacetat, Ethyl-butyrylacetat, Ethyl-2-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-2-25 phenylacetoacetat, Methyl-acetoacetat, 2-Methyl-1,3-cyclohexandion, 2-Methyl-1,3-cyclopentandion, Methyl-isobutyrylacetat, Methyl-3-oxopentanoat, Methylpivaloylacetat, 3-Oxoglutarensäure, Tetrahydrofuran-2,4-dion, 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptandion, 3-Benzoylpropionsäure, 1,4-Cyclohexandion, Dimethyl-acetylsuccinat, Ethyllävulinat, 2-Aminoanthrachinon, Anthrachinon, p-Benzochinon, 1,4-30 Dihydroxyanthrachinon, 1,8-Dihydroxyanthrachinon, 2-Ethylanthrachinon, Methyl-p-benzochinon, 1,4-Naphthochinon, Tetramethyl-p-benzochinon, 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion, 2-Benzoylbenzoesäure, 3-Benzoylpropionsäure, 5,6-Dimethoxyphthalaldehydsäure, Glyoxylsäure, Lävulinsäure, Methyl-(trans-4-oxo-2-pentenoat),

- Phthalaldehydsäure, Terephthalaldehydsäure, Dibutylmaleinat, Dibuthylsuccinat, Dibutylphthalat, Dicyclohexylphthalat, Diethyl-acetamidomalonat, Diethyladipat, Diethyl-Benzylmalonat, Diethyl-butyromalonat, Diethyl-ethoxymethylen-malonat, Diethylethylmalonat, Diethylfumarat, Diethylglutarat,
- 5 Diethyl-isopropylidenmalonat, Diethyl-maleinat, Diethylmalonat, Diethyl-methylmalonat, Diethylloxalat, Diethyl-3-oxoglutarat, Diethyl-phenylmalonat, Diethylphthalat, Diethyl-pimelat, Diethyl-sebacat, Diethyl-suberat, Diethyl-succinat, Diisobutylphthalat, Dimethyl-acethylendicarboxylat, Dimethyl-acetylsuccinat, Dimethyladipat, Dimethyl-2-aminoterephthalat, Dimethylfumarat, Dimethylglutaconat, Dimethylglutarat,
- 10 Dimethylisophthalat, Dimethylmalonat, Dimethyl-methoxymalonat, Dimethyl-(methylsuccinat), Dimethylloxalat, Dimethyl-3-oxo-glutarat, Dimethylphthalat, Dimethylsuccinat, Dimethylterephthalat, Ethylenglycoldiacetat, Ethylenglycoldimethacrylat, Monoethylfumarat, Monoethylmalonat, Monoethyladipat, Monomethylphthalat, Monomethylpimelat, Monomethylterephthalat, 1,2-Propylenglycoldiacetat, Triethyl-
- 15 methantricarboxylat, Trimethyl-1,2,3-propantricarboxylat, 3-Acetoxy-2-cyclohexen-1-on, Allyl-acetoacetat, Allyl-(cyanacetat), Benzylacetoacetat, tert-Butylacetoacetat, Butylcyanacetat, Chlorogensäure-Hemihydrat, Cumarin-3-Carbonsäure, Diethyl-ethoxycarbonylmethanphosphonat, Dodecylgallat, Dodecyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat, (2-Ethoxyethyl)acetat, Ethyl-(acetamidocyanacetat),
- 20 Ethylacetoacetat, Ethyl-2-aminobenzoat, Ethyl-(3-aminopyrazol-4-carboxylat), Ethyl-benzoxylacetat, Ethyl-butyrylacetat, Ethyl-cyanacetat, Ethyl-(2-cyan-3-ethoxyacrylat), Ethyl-cyanformiat, Ethyl-2-cyanpropionat, Ethyl-(3,3-diethoxypropionat), Ethyl-1,3-dithian-2-carboxylat, Ethyl-(2-ethoxyacetat), Ethyl-2-furancarboxylat, Ethylgallat, Ethylävinat, Ethylmandelat, Ethyl-2-methylactat, Ethyl-4-nitrocinnamat, Ethylloxamat,
- 25 Ethyl-2-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-4-oxocyclohexancarboxylat, Ethyl-5-oxohexanoat, Ethyl-2-phenylacetoacetat, Ethyl-2-phenylacetoacetat, Ethyl-(phenylglyoxylat), Ethyl-4-piperidincarboxylat, Ethyl-2-pyridincarboxylat, Ethyl-3-pyridincarboxylat, Ethyl-4-pyridincarboxylat, Ethylpyruvat, Ethylthioglycolat, Ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, (2-Hydroxyethyl)-methacrylat, (2-Hydroxypropyl)-methacrylat, 3-Indolacetat, (2-
- 30 Methoxyethyl)-acetat, (1-Methoxy-2-propyl)-acetat, Methylacetoacetat, Methyl-2-aminoabbenzoat, Methyl-3-aminocroconat, Methyl-cyanacetat, Methyl-(4-cyanbenzoat), Methyl-(4-formylbenzoat), Methyl-2-furancarboxylat, Methyl-isobutyrylacetat, Methyl-methoxyacetat, Methyl-2-methoxybenzoat, Methyl-3-oxopentanoat, Methyl-phenylglyoxylat, Methyl-phenylsulfonylacetat, Methylpivaloylacetat, Methyl-3-

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- pyridincarboxylat, 5-Nitrofurfurylidendiaceat, Propylgallat, Propyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, Methyl-(3-methylthiopropionat), Acetamid, Acetanilid, Benzamid, Benzanilid, N,N-Diethylacetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Diethyl-3-methylbenzamid, Diethyltoluamid, N,N-Dimethylacetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Diphenylacetamid,
- 5 N-Methylformamid, N-Methylformanilid, N-Acetylthioharnstoff, Adipinsäurediamid, 2-Aminobenzamid, 4-Aminobenzamid, Bernsteinsäurediamid, Malonsäurediamid, N,N'-Methylendiacylamid, Oxalsäurediamid, Pyrazin-2-carbonsäureamid, Pyridin-4-carbonsäureamid, N,N,N',N'-Tetramethylbernsteinsäurediamid, N,N,N',N',-Tetramethylglutarsäurediamid, Acetoacetanilid, Benzohydroxamsäure, Cyanacetamid, 2-Ethoxybenzamid, Diethyl-acetamidomalonat, Ethyl-(acetamidocyanacetat), Ethyloxamat,
- 10 Hippursäure-Na-Salz, N-(Hydroxymethyl)-acrylamid, L-(-) Michsäureamid, 2'-Nitroacetanilid, 3'-Nitroacetanilid, 4'-Nitroacetanilid, Paracetamol, Piperin, Salicylanilid, 2-Acetyl- $\gamma$ -butyrolacton,  $\gamma$ -Butyrolacton,  $\epsilon$ -Caprolacton, Dihydrocumarin, 4-Hydroxycumarin, 2(5H)-Furanon, 2,5-Dihydro-5-methoxy-2-furanon, Phthalid, Tetrahydrofuran-2,4-dion,
- 15 2,2,6-Trimethyl-1,3-dioxin-4-on,  $\gamma$ -Valerolacton, 4-Amino-1,3-dimethyluracil, Barbitursäure, O-Benzylloxycarbonyl-N-hydroxy-succinimid, Bernsteinsäureimid, 3,6-Dimethylpiperazin-2,5-dion, 5,5-Diphenylhydantoin, Ethyl-1,3-dioxoisoindolin-2-carboxylat, 9-Fluorenylmethyl-succinimidyl-carbonat, Hydantoin, Maleinimid, 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-on, 1-Methyl-2-pyrrolidon, Methyluracil, 6-Methyluracil,
- 20 Oxindol, Phenytoin, 1 (2H)-Phthalazonon, Phthalimid, 2,5-Piperazindion, 2-Piperidinon, 2-Pyrrolidon, Rhodanin, Saccharin, 1,2,3,6-Tetrahydrophthalimid, 1,2,3,4-Tetrahydro-6,7-dimethoxy-chinazolin-2,4-dion, 1,5,5-Trimethylhydantoin, 1-Vinyl-2-pyrrolidon, Di-tert-butylidicarbonat, Diethylcarbonat, Dimethylcarbonat, Dimethyldicarbonat, Diphenylcarbonat, 4,5-Diphenyl-1,3-dioxol-2-on, 4,6-Diphenylthieno(3,4-d)-1,3-dioxol-2-
- 25 on-5,5-dioxid, Ethylencarbonat, Magnesium-methoxid-methyl-carbonat, Monomethylcarbonat-Na-Salz, Propylencarbonat, N-Allylharnstoff, Azodicarbonsäurediamid, N-Benzylharnstoff, Biuret, 1,1'-Carbonyldiimidazol, N,N-Dimethylharnstoff, N-Ethylharnstoff, N-Formylharnstoff, Harnstoff, n-Methylharnstoff, N-Phenylharnstoff, 4-Phenylsemicarbazid, Tetramethylharnstoff, Semicarbazidhydrochlorid,
- 30 Diethyl-azodicarboxylat, Methylcarbamat, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanon, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-ethanol.

Weiterhin bevorzugt sind Anhydride wie:

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- Benzoessäureanhydrid, Benzol-1,2,4,5-tetracarbonsäure-1,2,4,5-dianhydrid, 3,3',4,4'-Benzophenontetracarbonsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Buttersäureanhydrid, Crotonsäureanhydrid, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid, Di-tert-butylidicarbonat, Dimethyldicarbonat, Dodecenybernsteinsäureanhydrid, Epicon B4400, Essigsäureanhydrid, 5 Glutarsäureanhydrid, Hexansäureanhydrid, Isatosäureanhydrid, Isobuttersäureanhydrid, Isovaleriansäureanhydrid, Maleinsäureanhydrid, Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid, 3-Nitrophthalsäureanhydrid, 5-Norboren-2,3-dicarbonsäureanhydrid, Phthalsäureanhydrid, 2-Phenylbuttersäureanhydrid, Pivalinsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid, cis-1,2,3,6-Tetrahydrophthalsäureanhydrid, Valeriansäureanhydrid.
- 10 Besonders bevorzugt sind Benzophenone wie:  
Benzophenon, 4-Aminobenzophenon, 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Benzophenon-2-carbonsäure, (S)-(-)-2-(N-Benzopropyl)-aminobenzophenon, 4,4'-Bis-(dimethylamino)-benzophenon, 4,4'-Bis-(diethylamino)-benzophenon, 3,4-Dimethoxybenzophenon, 4,4'-Dihydroxybenzophenon, 2,4-Dihydroxybenzophenon, 4-Hydroxybenzophenon, 15 2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenon, 4-Methoxybenzophenon, 4,4'-Dimethoxybenzophenon, 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon, 2-Chlorbenzophenon.

20

25

30

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**Appendix III: Polymerisationskatalysatoren: phenolische Verbindungen,  
Phenolderivate oder andere phenolische Polycyclen mit einer Reihe von oxidierbaren  
Hydroxylgruppen:**

5 Solche Polymerisationskatalysatoren z.B. sind vorzugsweise:

- Alizarin, 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure, 3-Aminophenol, Brenzkatechin, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan, Bis-(4-hydroxyphenyl)-methan, Chinalizarin, 4-Chlor-1-naphthol, Coniferylalkohol, 2,4- Diaminophenoldihydrochlorid, 3,5-Dichlor-4-hydroxyanilin, 1,4-  
10 Dihydroxyanthrachinon, 2,2-Dihydroxybiphenyl, 4,4-Dihydroxybiphenyl, 2,3-Dihydroxynaphthalin, 2,6-Diisopropylphenol, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzhydrazin, 2,5-Di-tert.-butyl-hydrochinon, 2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol, 4-Hydroxybiphenyl, 2-Hydroxydiphenyl-methan, 2-(2-Hydroxyphenyl)-benzothiazol, 5- Indanol, 2-Isopropoxyphenol, 4-Isopropyl-3-methylphenol, 5-Isopropyl-2-methylphenol, 4-  
15 Isopropylphenol, Laurylgallat, 2-Naphthol, 4-Nonylphenol, 3-(Pentadecyl)-phenol, 2-Propylphenol, 4-Propylphenol, Purpurin, Pyrogallol, 4-(1,1,3,3-Tetra-methylbutyl)-phenyl, 1,2,4-Trihydroxybenzol, 2,4,6-Trimethylphenol, 2,3,5-Trimethylphenol, 2,3,6-Trimethylphenol, 3,4,5-Trimethylphenol, 6,7-Dihydroxy-4-methylcumarin, 2-(2-Hydroxyethoxy)- benzaldehyd, 1-Naphthol, Nordihydroguaiarsäure, Octylgallat, Silibinin,  
20 3,4,6- Trihydroxybenzoesäure-octylester, 2,4,6-Tri-tert.-butylphenol, 2,4-Di-tert.-butylphenol, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Ethoxyquin, 1-Aminoanthraquinon, 2-Amino-5-chlorobenzophenon, 4-Aminodiphenyl-amin, 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalensulfonsäure, 2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazol, Benzanthron, Trioctyltrimellitat, trans-Chalcon, Bis-(4-amino-phenyl)-amin-sulfat, 2,2'-Ethylidenbis-(4,6-di-tert.-butylphenol), 2,2-Bis-(2,6-  
25 dibrom-4-(2-hydroxy-ethoxyphenyl)-propan, Bis-(3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-methan, 2,2-Bis-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-propan, Bismarck Brown Y, 1-Bromonaphthalen, 4-Butylanilin, 2-tert.-butyl-5-methylphenol, 1-Chloroanthrachinon, 2-Chloroanthrachinon, Triallyl-1,3,5-benzotricarboxylat, 1,1-Tris-(hydroxymethyl)-propan-trimethacrylat, Pentaerythrityl-triacrylat, 1,2,4-Trivinylcyclohexan, trans,cis-Cycloododeca-  
30 1,5,9-trien, Pentaerythritol-tetrabenzoat, 4,4'-Methylenbis-(2,6-di-tert.-butylphenol), 4,4'-Isopropyliden-bis(2,6-dichlorophenol), 4,4'-Isopropyliden-bis(2,6-dibromphenol), 4,4'-Isopropyliden-bis(2-(2,6-dibrom-phenoxy)ethanol, 2,2'Etylidenbis-4,6-di-tert.-butyl-phenol), 3-tert-Butyl-4-hydroxy-5-methyl-phenyl, 5-tert-Butyl-4-hydroxy-2-methyl-phenyl, Syringaldazin, 4,4'-Dimethoxy-triphenylmethan, Di-sec. Butylphenol.

Weiterhin besonders bevorzugt sind Stoffe, die mehrere Hydroxylgruppen besitzen wie:  
Ellagsäure, Gallussäure, Gallein, Gallangin, Myo-Inositol, Morin, Nitranilsäure,  
Phenolphthalein, Purpurin, Purpurogallin, Quinizarin, Chrysazin, Quercetin, Quinhydrin,  
Chloranilsäure, Carmin, Rhodizonsäure, Croconsäure, Melliticsäure, Hematoxilin, 9-Phenyl-  
5 2,3,7-trihydroxy-6-fluoren, 9-Methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluoren, Tetrahydroxy-p-  
benzochinon, 2,2',4,4'-Tetra-hydroxybenzophenon, Pyrogallol Red, 1-Nitrophloroglucinol,  
1,4-Dihydroxyanthrachinon, 5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon,  
Hexaoxocyclohexanooctahydrat, 5,7-Dihydroxyflavanon, 3',4'-Dihydroxy-flavanon,  
Glyoxalhydrat, 1,3,5-Tris(2-Hydroxyethyl)-isocyanursäure, Chinalizarin, 2,4,5-  
10 Trihydroxybenzamin.

15

20

25

30



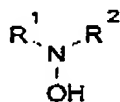
WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**Appendix IV:**

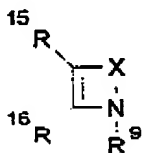
Appendix IV zeigt die Formeln von erfindungsgemäß als Zusatz zum Enzym-Komponenten-System (ECS) einsetzbaren Mediatoren/Mediationsverstärkern (NO-, NOH-, und HNR-OH-Verbindungen), die zusammen mit Oxidoreduktasen angewendet werden, wie z.B.:

Hydroxylamine. (Offenkettig oder cyclisch, aliphatisch oder aromatisch, heterocyclisch) der allgemeinen Formel,



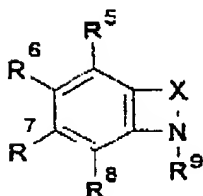
(I)

wie Verbindungen der allgemeinen Formel II:



(II)

25 wie Verbindungen der allgemeinen Formel III:



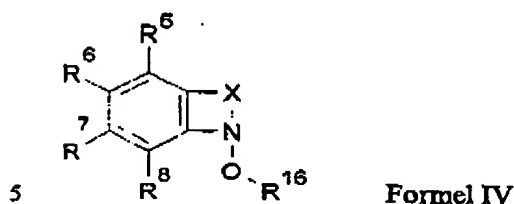
Formel III

WO 98/59108

82

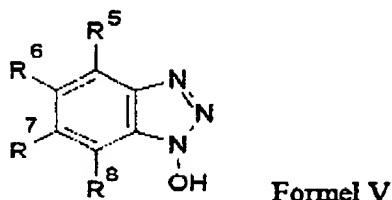
PCT/DE98/01689

wie Verbindungen der allgemeinen Formel IV:



wie Verbindungen, d.h. Derivate des 1-Hydroxybenzotriazols und des tautomeren Benzotriazol-1-oxides, sowie deren Ester und Salze bevorzugt

10 (Verbindungen der Formel V) :



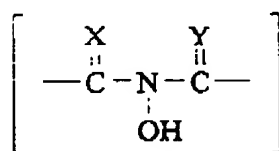
wie z.B. folgende Verbindungen:

- 15
- 1-Hydroxybenzotriazol,
  - 1-Hydroxybenzotriazol, Natriumsalz,
  - 1-Hydroxybenzotriazol, Kaliumsalz,
  - 1-Hydroxybenzotriazol Lithiumsalz,
  - 20 1-Hydroxybenzotriazol Ammoniumsalz,
  - 1-Hydroxybenzotriazol Calciumsalz,
  - 1-Hydroxybenzotriazol, Magnesiumsalz,
  - 1-Hydroxybenzotriazol-6-sulfonsäure, Mononatriumsalz,
  - 1-Methoxy-1H-benzotriazol
  - 25 1-Acetoxy-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-(4,5-f)-dioxolo-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-6-methyl-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-6-nitro-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-5,6-dimethyl-1H-benzotriazol
  - 30 1-Hydroxy-6-methoxy-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-5,6-dimethoxy-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-1H-benzotriazol-6-carbonsäure
  - 1,5-Dihydroxy-1H-benzotriazol
  - 1-Hydroxy-1H-benzotriazol-6-sulfonsäurehydrazid
  - 35 1-Hydroxy-1H-benzotriazol-6-carbonsäureamid
  - 1-Hydroxy-5-methoxy-1H-benzotriazol
  - 6-Amino-1hydroxy-1H-benzotriazol

- 6-Chlor-1-hydroxy-1H-benzotriazol  
 6-Acetamido-1-hydroxy-1H-benzotriazol  
 1-Hydroxy-1H-benzotriazol-6-carbonsäureethylester  
 1-Hydroxy-4-nitro-1H-benzotriazol  
 5 4-Chlor-1-hydroxy-1H-benzotriazol  
 1-Hydroxy-6-tert.-butyl-1H-benzotriazol  
 6-Cyclohexyl-1-hydroxy-1H-benzotriazol  
 6-Isopropyl-1-hydroxy-1H-benzotriazol  
 1-Hydroxy-6-phenyl-1H-benzotriazol  
 10 3-Methyl-3H-benzotriazol-1-oxid  
 2-Phenyl-2H-benzotriazol-1-oxid

Wie Verbindungen der allgemeine Formel A (cyclische N-Hydroxyverbindungen):

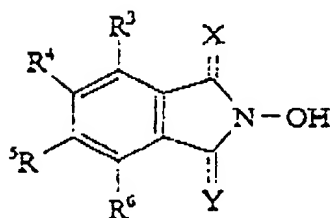
15



Formel A

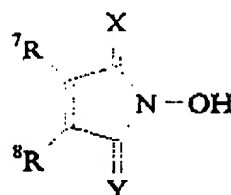
20

Wie Verbindungen der allgemeinen Formeln VI, VII, VIII oder IX:

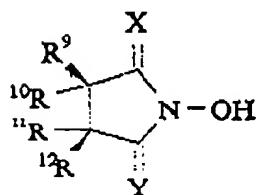


25

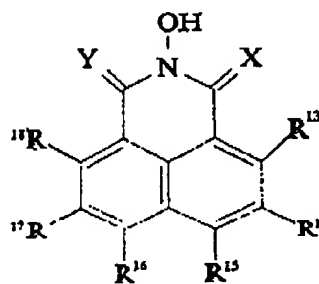
Formel VI



Formel VII



Formel VIII



Formel IX

WO 98/59108

84

PCT/DE98/01689

Wie z.B. Verbindungen wie:

N-Hydroxy-phthalimide sowie ggf. substituierte

N-Hydroxy-phthalimid-Derivate, N-Hydroxymaleimide sowie ggf. substituierte

N-Hydroxymaleimid-Derivate, N-Hydroxy-Naphthalsäureimide sowie ggf.

5 substituierte N-Hydroxy-Naphthalsäureimid-Derivate,

N-Hydroxysuccinimide und ggf. substituierte N-Hydroxysuccinimid-Derivate,

wie z.B.:

N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxy-benzol-1,2,4-tricarbonsäureimid,

N,N'-Dihydroxy-pyromellitsäurediimid,

10 N,N'-Dihydroxy-benzophenon-3,3',4,4'-tetracarbonsäurediimid,

wie z.B. (Formel VII):

N-Hydroxymaleimid, Pyridin-2,3-dicarbonsäure-N-hydroxyimid,

wie z.B. (Formel VIII):

N-1-Hydroxysuccinimid, N-1-Hydroxyweinsäureimid,

15 N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid,

exo-N-Hydroxy-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarboximid,

N-Hydroxy-cis-cyclohexan-1,2-dicarboximid,

N-Hydroxy-cis-4-cyclohexen-1,2-dicarbonsäureimid,

wie z.B. (Formel IX):

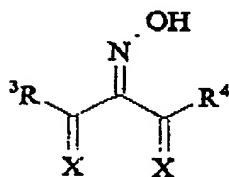
20 N-Hydroxynaphthalsäureimid-Natrium-Salz.

wie z.B. (sechsgliedriger Ring nach Formel A):

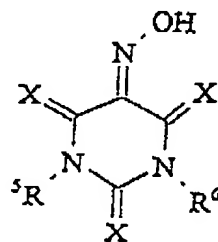
N-Hydroxyglutarimid.

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel X oder XI (Oxime):

25



Formel X



Formel XI

30

WO 98/59108

85

PCT/DE98/01689

Wie z.B. (Formel X):

2-Hydroxyiminomalonsäuredimethylester,

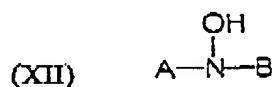
wie z.B. (Formel XI):

1-Methylviolursäure, 1,3 Dimethylviolursäure, Thioviolursäure, Alloxan-4,5-dioxim.

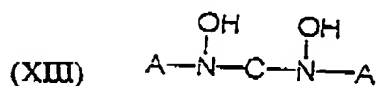
5 Alloxan-5-oxim Hydrat (Violursäure) und/oder dessen Ester oder Salze.

Wie Verbindungen aus der Klasse der N-Aryl-N-Hydroxy-Amide der  
allgemeinen Formel XII, XIII und XIV, XIV a, XIV b, XIX c, XIV d und XIV e:

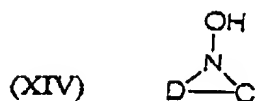
10



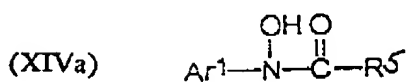
15



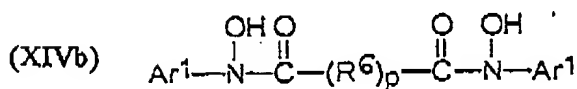
20



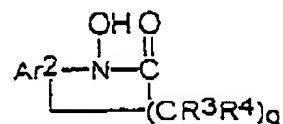
25



30



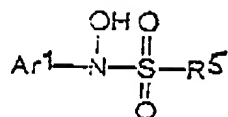
(XIVc)



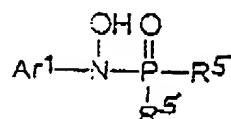
WO 98/59108

PCT/DE98/01689

(XIVd)

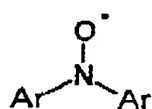


5 (XIVe)

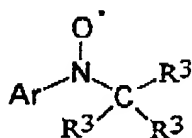


Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XV, XVI und XVII (Nitroxyl-  
10 Radikale/Nitroxide):

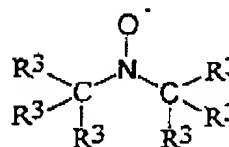
(XV)



(XVI)



(XVII)

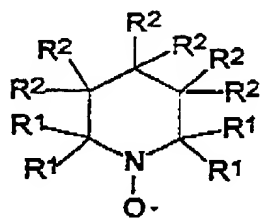


15

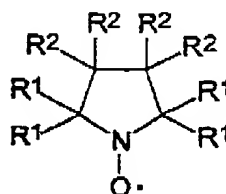
wie Verbindungen der allgemeinen Formel (XVII a und (XVII b) (Nitroxyl-  
Radikale):

20

XVII a



XVII b



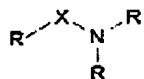
25

87

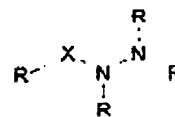
WO 98/59108

PCT/DE98/01689

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XVIII a (Amide) und XVIII b (Hydrazide):

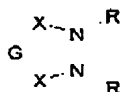


Formel XVIII a



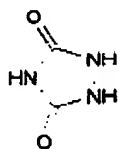
Formel XVIII b

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel (cyclische Hydrazide) XVIII c:

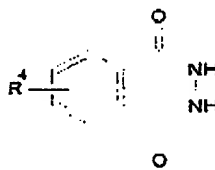


Formel XVIII c

Wie Verbindungen Urazole (Formel XVIII d) und Phthalhydrazide (Formel XVIII e):

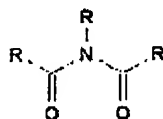


Formel XVIII d

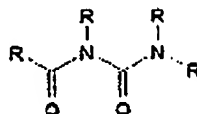


Formel XVIII e

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XIX (Imide):



Wie Verbindungen (Imide) der allgemeinen Formel XIX a:

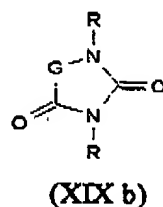


Formel XIX

WO 98/59108

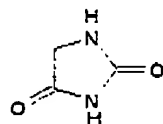
PCT/DE98/01689

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XIX b (cyclische Imide):



5

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XIX c (Derivate des Hydantoins):

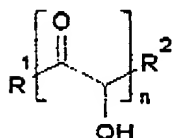


10

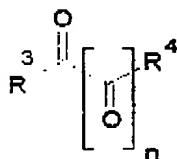
Formel XIX c

Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XX, wie  $\alpha$ -Hydroxycarbonylverbindungen der allg. Formel XX a,  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen der allgemeinen Formel XX b,  $\beta$ -Hydroxycarbonylverbindungen der allgemeinen Formel XX c, sowie  $\beta$ -Dicarbonylverbindungen der allgemeinen Formel XX d:

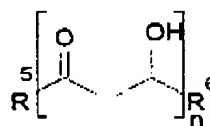
XX a



XX b

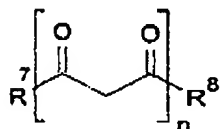


XX c



20

XX d



25

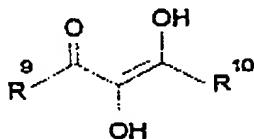


89

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

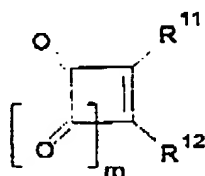
Wie Verbindungen der allgemeinen Formel XXI (offenkettige Verbindungen mit Doppelbindungen/Enole):



5

Formel XXI

Wie Verbindungen der allgemeinen Struktur XXII  
(cyclische Verbindungen, Reste nicht OH, Derivate der Quadratsäure, OH-Gruppe derivatisiert):



15

XXII

Wie z.B.:

Dreiecksäure, Quadratsäure, Krokonsäure, Rhodizonsäure.

20

\* Die Formelbezeichnungen (Reste/ R..) sind der Anmeldung DE 197 19 857. 0 dargelegt.

25

30

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**Appendix IVa:**

**Appendix IVa zeigt Verbindungen, die als Mediationsverstärker v.a. als Zusatz zusammen mit Mediatoren und Oxidoreduktasen zum erfindungsgemäßen Enzym-Komponenten-**  
5 **System (ECS) hinzugefügt werden können wie:**

**aliphatische Ether, arylsubstituierte Alkohole wie:**

- 2,3-Dimethoxybenzylalkohol, 3,4-Dimethoxybenzylalkohol,  
2,4-Dimethoxybenzylalkohol, 2,6-Dimethoxybenzylalkohol,  
10 Homovanillylalkohol,  
Ethylenglykolmonophenylether, 2-Hydroxybenzylalkohol,  
4-Hydroxybenzylalkohol, 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol,  
2-Methoxybenzylalkohol, 2,5-Dimethoxybenzylalkohol,  
3,4-Dimethoxybenzylamin, 2,4-Dimethoxybenzylamin-hydrochlorid,  
15 Veratrylalkohol, Coniferylalkohol,  
Olefine(Alkene), wie z.B. 2-Alkylphenol, 2-Allyl-6-methylphenol, Allylbenzol,  
3,4-Dimethoxy-propenylbenzol, p-Methoxystyrol, l-Allylimidazol,  
1-Vinylimidazol, Styrol, Stilben, Allylphenylether, Zimtsäurebenzylester,  
Zimtsäuremethylester, 2,4,6-Triallyloxy-1,3,5-triazin,  
20 1,2,4-Trivinylcyclohexan, 4-Allyl-1,2-dimethoxybenzol, 4-tert-  
Benzoessäurevinylester, Squalen, Benzoinallylether, Cyclohexen, Dihydropyran,  
N-Benzylzimtsäureanilid.

**Phenolether wie:**

- 25 2,3-Dimethoxybenzylalkohol, 3,4-Dimethoxybenzylalkohol, 2,4-  
Dimethoxybenzylalkohol, 2,6-Dimethoxybenzylalkohol, Homovanillylalkohol  
4-Hydroxybenzylalkohol, 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol,  
2-Methoxybenzylalkohol, 2,5-Dimethoxybenzylalkohol,  
3,4-Dimethoxybenzylamin, 2,4-Dimethoxybenzylamin-hydrochlorid,  
30 Veratrylalkohol, Coniferylalkohol, Veratrol, Anisol.

**Carbonylverbindungen wie:**

4-Aminobenzophenon, 4-Acetylbiphenyl Benzophenon, Benzil,  
Benzophenonhydrazon, 3,4-Dimethoxybenzaldehyd,

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- 3,4-Dimethoxybenzoesäure, 3,4-Dimethoxybenzophenon,  
4-Dimethylaminobenzaldehyd, 4-Acetylbiphenylhydrazon,  
Benzophenon-4-carbonsäure, Benzoylacetone, Bis(4,4'-  
dimethylamino)-benzophenon, Benzoin, Benzoinoxim, N-Benzoyl-N-  
5 phenyl-hydroxylamin, 2-Amino-5-chlor-benzophenon, 3-Hydroxy-4-  
methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, Anthrachinon-2-sulfonsäure,  
4-Methylaminobenzaldehyd, Benzaldehyd, Benzophenon-2-carbonsäure,  
3,3',4,4'-Benzophenontetracarbonsäuredianhydrid, (S)-(-)-2-(N-Benzylpropyl)-  
aminobenzophenon, Benzylphenyllessigsäureanilid, N-Benzylbenzanilid,  
10 4,4'-Bis-(dimethylamino)-thiobenzophenon,  
4,4'-Bis-(diacetylamino)-benzophenon,  
2-Chlorbenzophenon, 4,4'-Dihydroxybenzophenon, 2,4-  
Dihydroxybenzophenon, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehydhydrazin,  
Hydroxybenzophenon, 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon,  
15 4-Methoxybenzophenon, 3,4-Dihydroxybenzophenon, p-Anissäure,  
p-Anisaldehyd, 3,4-Dihydroxybenzaldehyd, 3,4-Dihydroxybenzoesäure,  
3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyd, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure,  
4-Hydroxybenzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Vanillinsäure.

20

25

30

**Appendix 5: mögliche Oxidationsreaktionen des Enzym-Komponenten-Systems:****2) Oxidation von ungesättigten Aliphaten**

- 5 a) Herstellung von Epoxiden
- b) Herstellung von Verbindungen über Epoxierung
- c) Herstellung von Arenoxiden
- d) Herstellung von Phenolen
- e) Herstellung von *cis* Dihydrodiolen

10

**3) Baeyer-Villiger Oxidationen**

- a) Baeyer-Villiger Conversion von Steroiden

**15 4) Oxidation von Heterocyclen**

- a) Transformation von organischen Sulfiden
- b) Oxidation von Schwefelverbindungen
- c) Oxidation von Stickstoffverbindungen (Bildung von N-Oxiden etc.)
- 20 d) Oxidation von anderen Heteroatomen

**5) Kohlenstoff-Kohlenstoff Dehydrogenierungen**

- a) Dehydrogenierung von Steroiden

25

**6) Andere Oxidationsreaktionen**

- a) Oxidation von Alkoholen und Aldehyden
- b) Oxidation von aromatischen Methylgruppen zu Aldehyden
- 30 c) Oxidative Kupplung von Phenolen
- d) Oxidativer Abbau von Alkylketten ( $\beta$ -Oxidation etc.)
- e) Bildung von Peroxiden oder Perverbindungen
- f) Initiierung von Radikalkettenreaktionen

35

40

**Patentansprüche**

- 1. Enzym-Komponenten-System (ECS) als Oxidations- und Bleichsystem zur Herstellung von speziellen hochselektiven Oxidationsmitteln,**
- 5 bestehend aus:
- a) Systemkomponente 1): mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 oder 3.1.7 und/oder mindestens einer Hydrolase aus der Enzymklasse 3.5, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5 oder 3.5.99,
- b) Systemkomponente 2): mindestens einer Fettsäure, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub>
- 10 ( gesättigt, einfach- oder mehrfach ungesättigt),
- c) Systemkomponente 3): mindestens einem Precursor-Oxidationsmittel zur Reaktion mit den Enzymen,
- d) Systemkomponente 4): mindestens einem Keton aus der Gruppe der Carbonylverbindungen.
- 15
- 2. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Systemkomponente 1) Enzyme aus der Klasse 3.1.1.3: Lipasen (Triacylglycerin Lipase, Triglycerinacylhydrolasen) eingesetzt werden.**
- 20 **3. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß als Systemkomponente 1) Enzyme bevorzugt aus der Klasse 3.5.1.4 Amidasen und/oder 3.5.5.1 Nitrilasen eingesetzt werden.**
- 4. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß**
- 25 **die Herstellung der Enzyme der Klasse 3.1.1.3 (Lipasen) aus Organismen wie Candida antarctica, Candida rugosa, Candida lipolytica, Candida cylindracea, Candida spec., Geotrichum candidum, Humicola lanuginosa, Penicillium cambertii, Penicillium roquefortii, Aspergillus spec., Mucor javanicus, Mucor mehei, Rhizopus arrhizus, Rhizopus niveus, Rhizopus delamar, Rhizopus spec. Chromobacterium viscosum, Pseudomonas cepacia,**
- 30 **Pseudomonas spec., aus Weizenkeimlingen oder Pankreas (Schwein oder andere Quellen) u.a. erfolgt.**
- 5. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung der Enzyme der Klasse 3.5.1.4 und 3.5.5.1 aus Organismen wie**

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas spec.*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus spec.*, *Brevibacterium spec.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Rhodococcus spec.* u.a. erfolgt.

- 5 6. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es Enzyme aus Pilzen, Bakterien, Tieren oder Pflanzen, die aus natürlichen oder gentechnisch veränderten Organismen gewonnen werden, enthält.
- 10 7. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Katalysatoren modifizierte Enzyme, Enzymbestandteile, prosthetische Gruppen oder Mimicsubstanzen eingesetzt werden können.
8. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es  
15 als Systemkomponente 2) eine oder mehrere, gesättigte, einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, bevorzugt C<sub>6</sub> bis C<sub>26</sub> nach Appendix 1) enthält:
9. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es  
als Systemkomponente 2) bevorzugt Tetradecansäure (Myristinsäure) und/oder  
20 Dodecansäure (Laurinsäure) enthält.
10. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es  
als Systemkomponente 3) mindestens ein Precursor-Oxidationsmittel wie:  
Peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), organische Peroxide, wie 3-Chlorperoxybenzoesäure,  
25 Monoperoxyphthalsäure-Mg-Salz, Di-tert.-butylperoxid, Cumolhydroperoxid,  
Lauroylperoxid, Chlorperoxybenzoesäure, Dicumylperoxid, Ethymethyl-keton-peroxid,  
Benzoylperoxid, Diperoxidodecandionsäure-Na-Salz, u.a. und Perverbindungen, wie  
Perborate, Persulphate, Percarbonate, Perphosphate, Percarbamide, Perchlorate u.a. enthält.
- 30 11. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß  
es als Systemkomponente 3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-aktivierende Ionen Mo<sup>6+</sup>, W<sup>6+</sup>, Va<sup>5+</sup> und/oder  
Verbindungen wie Nitrilamine und/oder Dicyanamide enthält.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

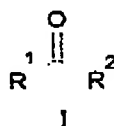
12. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 3) bevorzugt  $H_2O_2$  enthält.

13. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 3)  $H_2O_2$  enthält, welches mittels Glukose und GOD in situ generiert wird.

14. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 3) neben Perverbindungen Beichaktivatoren wie TAED (Tetraacetylenylendiamin), TAGU (Tetraacetylglucuril) und iso-NOBS (Natrium-p-isonanonyloxybenzolsulfonat) enthalten kann.

15. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 3) neben den Peroxiden und/oder Perverbindungen Luft oder Sauerstoff bei Normaldruck oder leichtem Überdruck bis zu 2 bar enthält.

16. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 4) mindestens ein Keton der allgemeinen Formel I enthält:

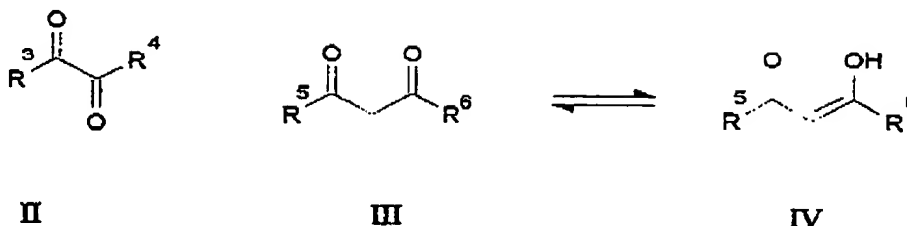


25 Die Reste  $R^1$  und  $R^2$  können gleich oder ungleich sein und aliphatische oder aromatische Gruppen darstellen. Weiterhin können die Reste  $R^1$  und  $R^2$  einen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel enthalten kann.

17. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 4) 1,2- Diketone der (Formel II) und 1,3-Diketone der (Formel III) bzw. Polyketone (Polyketide) sowie die tautomeren Enole (Formel IV) enthält,

WO 98/59108

PCT/DE98/01689



wobei die Reste  $R^3$  bis  $R^6$  jeweils wieder gleich oder ungleich sein können und aliphatische oder aromatische Gruppen darstellen können. Weiterhin können die Reste  $R^3$  und  $R^4$  und die Reste  $R^5$  und  $R^6$  einen gemeinsamen Ring bilden, der neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel enthalten kann.

18. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 4) neben allgemeinen Carbonylverbindungen Ketone wie allgemein Hydroxyketone,  $\alpha,\beta$  - ungesättigte Ketone, Oxicarbonsäuren, Chinone und Halogenketone enthält.

19. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es als Systemkomponente 4) Verbindungen, die in Appendix 2) aufgeführt sind, enthält.

20. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es Polymerisationskatalysatoren wie v.a. phenolische Substanzen, bzw. Polycyclen mit mehreren oxidierbaren Hydroxylgruppen nach Appendix 3) enthält.

21. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß als zusätzliche Systeme enzymatische Oxidationssysteme mit enzymwirkungsverstärkenden Verbindungen zugesetzt werden können, enthaltend:

- a) mindestens einen geeigneten Oxidationskatalysator
- b) mindestens ein geeignetes Oxidationsmittel,
- c) mindestens einen Mediator ausgewählt aus der Gruppe der Hydroxylamine, Hydroxylaminderivate, Hydroxamsäuren, Hydroxamsäurederivate, der aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen Verbindungen, die mindestens eine N-Hydroxy-, Oxim-, N-Oxi-, oder N,N'-Dioxi-Funktion enthalten und/oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der Amide wie z.B. Hydrazide oder 1,2,4-Triazolidin-3,5-dione (Urazole)



WO 98/59108

PCT/DE98/01689

und /oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der Imide wie  
z.B. Hydantoine  
und/oder mindestens einen Mediator aus der Gruppe der  
Oxokohlenstoffe.

5

22. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 21 , dadurch gekennzeichnet, daß  
als zusätzliche Systeme enzymatische Oxidationssysteme mit enzymwirkungsverstärkenden  
Verbindungen zugesetzt werden können, enthaltend:

mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe der

- 10 Carbonylverbindungen, aliphatischen Ether, Phenolether oder Olefine(Alkene),  
und/oder mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe der  
NO-, NOH-HRN-OH-Verbindungen und/oder der Amide wie Hydrazide oder  
Urazole und/oder der Imide wie Hydantoine und/oder der Oxokohlenstoffe.

- 15 23. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 22 , dadurch gekennzeichnet, daß  
als zusätzliche Systeme enzymatische Oxidationssysteme mit enzymwirkungsverstärkenden  
Verbindungen zugesetzt werden können, enthaltend:

mindestens ein Mediationsverstärker, ausgewählt aus der Gruppe der  
kationradikalbildende Substanzen des Phenothiazintyps und/oder des Phenoxazintyps

- 20 und/ oder des (R=N-N=R)-Typs\* ( z.B.ABTS),  
und/oder von arylsubstituierten Alkoholen (Nichtphenole) wie z.B. Veratrylalkohol,  
und/oder Phenolabkömmlinge wie p-Hydroxycinnamic acid, 2,4- Dichlorphenol, p-  
Hydroxybenzol-Sulfonat, Vanillin (4-Hydroxy-3-Methoxy-benzaldehyd), p-  
Hydroxybenzoesäure, 5-Amino-2-Hydroxy-benzoesäure (5-Aminosalicylsäure) und/oder  
25 Radikalkationverbindungen nach „Wurster“ wie para- Diephenyldiamine bevorzugt: N,N-  
Dimethyl-p-phenyldiamin; N,N-Diethyl-p-phenyldiamin; N,N,N',N'-Tetramethyl-p-  
phenyldiamin; 2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenyldiamin und/ oder Radikalanionen, z.B.  
Semichinone, die bei der enzymatischen Oxidation von Hydrochinonen entstehen können.

- 30 24. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 21 , dadurch gekennzeichnet, daß  
als Oxidationskatalysatoren Enzyme wie Oxidoreduktasen der Klassen 1.1.1. bis 1.97  
eingesetzt werden, bevorzugt:

Cellobiose: oxigen-1-oxidoreductase (Cellobiose oxidase) (1.1.3.25),

Cellobiose: quinone -1-oxidoreductase (1.1.5.1), Bilirubinoxidase (1.3.3.5),

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

- Cytochromoxidase (1.9.3), Oxigenasen, Lipoxigenasen (1.13, 1.14),  
Superoxid-dismutase (1.15.11), Ferrioxidase, z.B. Ceruloplasmin (1.16.3.1),  
1.10, wie Catechol Oxidase (Tyrosinase) (1.10.3.1), L-Ascorbate Oxidase  
(1.10.3.3), O-Aminophenol Oxidase (1.10.3.4) und Laccase
- 5 (Benzoldiol:Oxygen Oxidoreduktase) (1.10.3.2) ,  
1.11., wie Cytochrom-C Peroxidase (1.11.1.5), Catalase (1.11.1.6), Peroxidase (1.11.1.7)  
Iodid-Peroxidase (1.11.1.8), Glutathione-Peroxidase (1.11.1.9), Chlorid Peroxidase  
(1.11.1.10), L-Ascorbat-Peroxidase (1.11.1.11),  
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathione-Peroxidase (1.11.1.12), Mangan Peroxidase  
10 (1.11.1.13), Diarylpropan-Peroxidase (Ligninase, Lignin Peroxidase) (1.11.1.14).
25. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 21 und 24 , dadurch gekennzeichnet,  
daß als Oxidationskatalysatoren bevorzugt Enzyme wie Laccasen und/oder Peroxidasen  
eingesetzt werden.
- 15
26. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 25 , dadurch gekennzeichnet, daß es  
bevorzugt Laccasen und/oder Peroxidasen aus Weißfäulepilzen wie z.B.  
Trametes versicolor, Trametes spec. Phlebia spec, Pleurotus spec.  
Phanerochaete chrysosporium, Agaricus spec., u.a., andere Pilze, Bakterien,  
20 Pflanzen und tierische Zellen, die aus natürlichen oder gentechnisch  
veränderten Organismen gewonnen werden, enthält.
27. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß  
als Enzym-Katalysatoren modifizierte Enzyme, Enzymbestandteile, prosthetische Gruppen  
25 oder Mimicsubstanzen eingesetzt werden können.
28. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß  
als zusätzliche Oxidationsmittel, bevorzugt Luft, Sauerstoff, Ozon, Peroxidverbindungen  
wie  $H_2O_2$ , organische Peroxide, Persäuren wie die Peressigsäure, Perameisensäure,  
30 Perschwefelsäure, Persalpetersäure, Metachlorperoxidbenzoesäure, Perchlorsäure,  
Perverbindungen wie Perborate, Percarbonate, Persulfate oder Sauerstoffspezies und deren  
Radikale wie OH-Radikal, OOH-Radikal,  $OH^{\cdot}$ -Radikal, Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Dioxygenyl-  
Kation ( $O_2^+$ ), Singulett-Sauerstoff, Ozonid ( $O_3^{\cdot-}$ ), Dioxirane, Dioxitane oder Fremy Radikal  
eingesetzt werden.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

29. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Mediator und zusätzliche Mediationsverstärker solche nach Appendix IV und IVa) eingesetzt werden.

5 30. Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 21 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Mediator/ Mediationsverstärker-Verhältnis 5000:1 bis 5:1 besonders bevorzugt 500:1 bis 5:1 beträgt.

31. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 30  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
10 von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen,  
wobei die Reaktion des Enzym-Komponentensystems in einem pH-Bereich von pH 2 bis  
11, vorzugsweise pH 3 bis 9, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis  
95 °C, bei einer Stoffdichte von 0.5 bis 40%, bevorzugt 4 bis 15 % in Gegenwart von  
Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck (bis 2 bar) durchgeführt  
15 wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Humicola lanignosa* in einer Konzentration  
von 0.05 bis 5 mg, bevorzugt von 0.05 bis 2 mg, Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* in  
einer Konzentration von 40 bis 200 IU  
und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>,  
bevorzugt Tetradekansäure und/oder Dodekansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 20  
20 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg  
und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer  
Konzentration von 0.05 bis 20 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis  
10 mg  
und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration  
25 von 0.05 bis 20 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg jeweils bezogen  
auf 1g atro Zellstoff eingesetzt werden.

32. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 31  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
30 von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen,  
wobei vor und/oder nach der Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems eine saure Wäsche  
oder Q-Stufe eingesetzt wird und daß die saure Wäsche bei  
60-120 °C, bei pH 2 bis 5,5, für 30-90 min und 4-20% Stoffdichte durchgeführt wird  
und daß die Q-Stufe mit 0.05 - 1%, vorzugsweise 0.2 bis 0.5 % Chelatbildner,

bei 60-100°C, bei pH 2 bis 5,5, für 30-90 min und 4-20% Stoffdichte durchgeführt wird.

33. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 31 und 32  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
5 von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen,  
wobei für die saure Wäsche und die Q-Stufe 1 Std., 60 - 90°C, pH 2 bis 5 und 10%  
Stoffdichte eingehalten werden.
34. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1, 31 bis 33  
10 in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen  
wobei es vor oder nach jeder möglichen Behandlung des Zellstoffes, sei es  
ein Kochverfahren, Bleichstufen oder andere Vor- und/oder Nachbehandlungen  
in Ein- oder Mehrzahl eingesetzt werden kann, wie alkalisches leaching, alkalische  
15 Extraktion, Wäsche, Saure Behandlung, Q-Stufe, O<sub>2</sub>-Delignifizierungsstufe, Peroxidbleichstufe,  
O<sub>2</sub>- unterstützte Peroxidstufe, Druckperoxidstufe, Persäurestufe, persäureunterstützte O<sub>2</sub>- bzw.  
Peroxidstufe, Ozonbleichstufe, Dioxiranstufe, Polymetoxalat-Stufe Cl-Delignifizierungsstufe,  
ClO<sub>2</sub> -Bleichstufe, Cl/ClO<sub>2</sub> - Bleichstufe, reduktive Bleichstufen, Sulfonierungsstufen, NO/NO<sub>2</sub>-  
Behandlungen, Nitrosylschwefelsäure-Behandlung, Quellstufen, Enzymbehandlungen wie z.B.  
20 Behandlungen mit Hydrolasen wie Cellulasen und/oder Hemicellulasen (z.B. Xylanase,  
Mannanase etc.) und/oder Pektinasen und/oder Proteinasen und/oder Lipasen und/oder  
Amidasen und/oder Oxidoreduktasen wie z.B. Laccasen und/oder Peroxidasen etc. bzw.  
mehrere kombinierte Behandlungen.
- 25 35 Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 und 34  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen  
wobei die Quellstufe mit Hilfe von Stoffen wie z.B.: Glycole wie: Propylenglycol,  
Ethylenglycol, Glycolether wie: Ethylenglycoldimethylether etc. aber auch  
30 Lösungsmittel wie z.B. Alkohole wie: Methanol, Ethanol, Butanol, Amyl-alkohol,  
Cyclohexanol, Benzylalkohol, Chlorhydrin, Phenole wie: Phenol, Methyl- und  
Methoxyphenole, Aldehyde wie: Formaldehyd, Chloral, Mercaptane wie:  
Buthylmercaptan, Benzylmercaptan, Thioglycolsäure, Organische Säuren wie:  
Ameisensäure, Essigsäure, Chloressigsäure, Amine wie Ammoniak, Hydrazin,

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

**Hydrotrope Lösungsmittel wie: z.B. konz. Lösungen von Natriumbenzoat, Sonstige wie: Benzole, Pyridine, Dioxan, Acetessigsäureethylester, andere basische Lösungsmittel wie OH/H<sub>2</sub>O, bzw. OH/Alkohole u.a. durchgeführt wird.**

- 5 36. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 35  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen  
wobei Komplexbildner der Reaktionslösung zugegeben werden wie  
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA),  
10 Hydroxyethylendiamintriessigsäure (HEDTA), Diethylentriaminpenta-  
methylenphosphonsäure (DTPA), Nitrilotriessigsäure (NTA), Polyphosphorsäure  
(PPA) oder andere Eisen-, Mangan-, oder Kupfer-Komplexoren, z.B. Diethylamin,  
Hydroxylamin eingesetzt werden.
- 15 37. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 36  
in einem Verfahren zur Delignifizierung und /oder Veränderung und/oder Bleiche  
von Zellstoffen aus Holz und Einjahrespflanzen und Holzstoffen und Deinkstoffen  
wobei es in mehreren Stufen durchgeführt wird, wobei zwischen jeder Stufe eine Wäsche  
oder eine Wäsche und eine Extraktion mit Lauge oder weder Wäsche noch Extraktion  
20 stattfindet.
38. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 37  
zur Behandlung von Papierfabrikationsabwässer (Schleiferei-Abwasser, TMP-Abwasser)  
und von Abwässern anderer Industriezweige, wie Zellstoffabwässer und  
25 Textilfabrikationsabwässer u.a., wobei  
die Reaktion des Enzym-Komponentensystems in einem pH-Bereich von pH 2 bis  
11, vorzugsweise pH 3 bis 6, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis  
95 °C, in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normalkdruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck  
(bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Aspergillus spec.*  
30 in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg, bevorzugt von 0.05 bis 10 mg  
und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>,  
bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 200  
mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg

- und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg
- und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg
- und daß Polymerisationskatalysatoren, bevorzugt Purogallin, in einer Konzentration von 0.005 bis 200 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.005 bis 50 mg jeweils bezogen auf 1 Liter Abwasser eingesetzt werden.
39. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 38 zur Herstellung von Ligninlösungen oder Gelen, von entsprechenden Bindern/Klebern und zur Herstellung von Holzverbundstoffen, wobei die Reaktion des Enzym-Komponentensystems in einem pH-Bereich von pH 2 bis 11, vorzugsweise pH 3 bis 6, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis 95 °C, in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem  $O_2$ -Überdruck (bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Humicola lanuginosa* in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg, bevorzugt von 0.05 bis 10 mg und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt  $C_8$  bis  $C_{16}$ , bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 200 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg und daß Polymerisationskatalysatoren, bevorzugt Purogallin, in einer Konzentration von 0.005 bis 200 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.005 bis 50 mg, jeweils bezogen auf 1 Liter Abwasser eingesetzt werden.
40. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 39 in einem Verfahren zur enzymatischen Druckfarbentfernung beim Deinken von Altpapier, wobei die Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems in einem pH-Bereich von pH 7 bis 11, vorzugsweise pH 7 bis 9, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis 95 °C, in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis

- leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck (bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1:  
Lipase aus *Humicola lanuginosa* in einer Konzentration von 5 bis 500 mg, bevorzugt von 5  
bis 100 mg  
und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>,  
5 bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 5 bis 2000  
mg, bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis 500 mg  
und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer  
Konzentration von 5 bis 5000 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis  
1000 mg und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer  
10 Konzentration von 5 bis 2000 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis 500 mg  
und daß phenolische Substanzen, bzw. Polycyclen mit mehreren oxidierbaren  
Hydroxylgruppen zur Veränderung des pH-Optimums der Druckfarbenablösereaktion und  
Beeinflussung des Altpapier-Quellverhaltens, bevorzugt Bisphenol A, in einer  
Konzentration von 1 bis 2000 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 500 mg  
15 jeweils auf 1 kg luro Altpapier bezogen, eingesetzt werden.

41. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 40  
in einem Verfahren zur enzymatischen Druckfarbentfernung beim Deinken von  
20 Altpapier, wobei  
Reduktionsmittel, wie: Natrium-Bisulfit, Natrium-Dithionit, Ascorbinsäure,  
Thiolverbindungen, Mercaptoverbindungen oder Glutathion mit Vorzug Natrium-Bisulfit  
und/oder Natrium-Dithionit in einer Konzentration von 0.1 bis 1000 mg pro kg luro  
Altpapier, bevorzugt in einer Konzentration von 0.1 bis 200 mg pro kg Altpapier zugesetzt  
25 werden.

42. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 41  
in einem Verfahren zur enzymatischen Druckfarbentfernung beim Deinken von  
Altpapier,  
30 wobei zur Sammlung der Druckfarbpartikel und zur Schaumerzeugung bei der Flotation  
handelsübliche Sammler, bevorzugt Incopur-Typen, z.B. Incopur RSGA in einer  
Konzentration von 1 bis 5000 mg pro kg luro Altpapier, bevorzugt von 1 bis 1000 mg pro  
kg Altpapier zugesetzt werden.

WO 98/59108

PCT/DE98/01689

43. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 42  
in einem Verfahren zur enzymatischen Druckfarbentfernung beim Deinken von  
Altpapier,  
wobei weitere Enzyme wie Cellulasen und/oder Hemicellulasen wie Xylanase und/oder  
5 Mannanase und/oder Pektinasen und/oder Oxidoreduktasen zugegeben werden.
44. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 43  
als Oxidationssystem in der organischen Synthese, wobei  
die Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems in einem pH-Bereich von pH 2 bis  
10 11, vorzugsweise pH 3 bis 9, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis 95  
°C, in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck  
(bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Hemicola*  
*lanuginosa* in einer Konzentration von 0.5 bis 5 mg, bevorzugt von 0.05 bis 3 mg  
und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>,  
15 bevorzugt Tetradekansäure und/oder Dodekansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 100  
mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 30 mg  
und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer  
Konzentration von 0.05 bis 100 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05  
bis 30 mg  
20 und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration  
von 0.05 bis 100 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 30 mg  
jeweils auf 10 mmolar Substrat bezogen, eingesetzt werden.
45. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 44  
25 als Oxidationssystem in der organischen Synthese, wobei  
als Substrate für Oxidationsreaktionen für das erfindungsmäßige z.B. aromatische  
Alkohole oder aromatische Methylverbindungen eingesetzt werden.
46. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 45  
30 in einem Verfahren zur enzymatischen Kohleverflüssigung, wobei  
die Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems in einem pH-Bereich von pH 2 bis  
11, vorzugsweise pH 3 bis 9, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis 95  
°C, bei einer Stoffdichte von 0.5 bis 40%, vorzugsweise bei einer Stoffdichte von 4 bis 15%,  
in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck (bis 2



WO 98/59108

PCT/DE98/01689

bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Humicola lanuginosa* in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg, bevorzugt von 0.05 bis 10 mg und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 100 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg jeweils auf 1g Kohle (Braunkohle) bezogen, eingesetzt werden.

47. Verwendung des Enzym-Komponenten-System nach Anspruch 1 bis 46 in einem Verfahren zur Bleiche in Waschmitteln, wobei die Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems in einem pH-Bereich von pH 2 bis 12, vorzugsweise pH 3 bis 10, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 30 bis 95 °C, in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck (bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Humicola lanuginosa* in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg, bevorzugt von 0.05 bis 10 mg und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg jeweils auf 100 ml Waschlösung bezogen, eingesetzt werden.

48. Verwendung des Enzym-Komponenten-Systems nach Anspruch 1 bis 47 in einem Verfahren zur Bleiche in Waschmitteln, wobei das System als Zusatz zu Waschformulierungen mit allen technisch üblichen und bekannten waschaktiven Substanzen oder Waschmitteladditiven eingesetzt wird.

49. Verwendung des Enzym-Komponenten-Systems nach Anspruch 1 bis 48

- in einem Verfahren zur Bleiche und/oder beim Entfärben von Textilgeweben, wobei die Reaktion des Enzym-Komponenten-Systems in einem pH-Bereich von pH 2 bis 11, vorzugsweise pH 3 bis 9, bei einer Temperatur von 20 bis 95 °C, vorzugsweise 40 bis 95 °C, bei einer Stoffdichte von 0.5 bis 40%, bevorzugt 4 bis 15%, in Gegenwart von
- 5 Sauerstoff oder Luft bei Normaldruck bis leichtem O<sub>2</sub>-Überdruck (bis 2 bar) durchgeführt wird und die Systemkomponente 1: Lipase aus *Humicola lanuginosa* in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg, bevorzugt von 0.05 bis 5 mg
- und die Systemkomponente 2: Fettsäuren in ein oder Mehrzahl, bevorzugt C<sub>8</sub> bis C<sub>16</sub>, bevorzugt Tetradecansäure und/oder Dodecansäure in einer Konzentration von 0.05 bis 20
- 10 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg
- und die Systemkomponente 3: Precursor-Oxidationsmittel, bevorzugt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.05 bis 20 mg (100%ig), bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg
- und die Systemkomponente 4: Ketone, bevorzugt Benzophenone in einer Konzentration
- 15 von 0.05 bis 20 mg, bevorzugt in einer Konzentration von 0.05 bis 10 mg jeweils auf 1g Denim bezogen, eingesetzt werden.

20

25

30